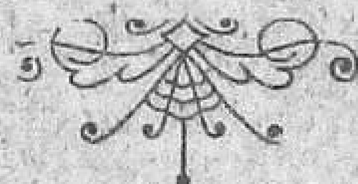
Prof. FRANCESCO SANFELICE

L'AZIONE PATOGENA DEI BLASTOMICETI

Contributo alla etiologia dei tumori maligni



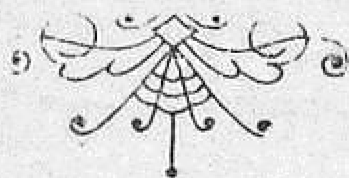
Unione Tipografico-Editrice Torinese
MILANO — TORINO — FIRENZE — NAPOLI

1902

Prof. FRANCESCO SANFELICE

L'AZIONE PATOGENA DEI BLASTOMICETI

Contributo alla etiologia dei tumori maligni



Unione Tipografico-Editrice Torinese
MILANO — TORINO — FIRENZE — NAPOLI

1902

Estratto dagli *Annali d'Igiene Sperimentale*, fasc. I, Anno 1903

Roma, 1902 — Tip. Nazionale di G. Bertero & C

Istituto d'Igiene della Regia Università di Cagliari

L'azione patogena dei Blastomiceti

Contributo alla etiologia dei tumori maligni

del professore **FRANCESCO SANFELICE**

(con la tavola II).

I.

Riassunto dei lavori recenti pubblicati intorno all'argomento.

Numerose ricerche sono state pubblicate in questi ultimi anni intorno all'azione patogena dei blastomiceti, alcune in rapporto alla importanza che questi parassiti hanno nella genesi dei tumori maligni, altre riguardanti lesioni affatto diverse dal cancro e dal sarcoma.

Le numerose ricerche pubblicate sui blastomiceti fino a tutto il 1897, tanto dal lato morfologico, quanto da quello sperimentale, tendevano più a mettere in dubbio la importanza dei saccaromiceti nella produzione dei neoplasmi maligni, anzi che ad affermarla.

Io era per conseguenza solo a sostenere, in base ai risultati ottenuti con le inoculazioni del *Saccharomyces neoformans* negli animali suscettibili a contrarre tumori maligni, che questo parassita inoculato in coltura pura negli organi dei cani può dar luogo alla produzione di tumori epiteliali, i quali per decorso e struttura sono perfettamente identici ai tumori epiteliali maligni che noi osserviamo nell'uomo, ed inoculato nelle vene degli animali dà luogo alla produzione di tumori di natura connettivale.

Tutti questi risultati io avevo ottenuto con il *Saccharomyces*

neoformans, uno dei pochi blastomiceti che trovai dotato di potere patogeno fra tanti che avevo isolati dallo ambiente.

Non avevo più oltre tentato d'isolare blastomiceti patogeni dai tumori maligni dell'uomo, perchè non potevo disporre di un grandissimo numero di tumori, quale occorreva in questa specie di ricerche e perchè mi ero convinto che lo isolamento dei parassiti dai tumori di lunga data era cosa tutt'altro che facile. Solamente dai neoplasmi a decorso rapido o acuto, come li chiama il Plimmer, e con reperto parassitario abbondante, io prevedeva facile la coltura del parassita, ma questi casi non sono punto frequenti e per ciò difficilmente potevano capitarmi.

Per queste ragioni ho seguito nelle mie ricerche la via indiretta e non quella diretta, tanto più che dai primi esperimenti di inoculazione con le colture pure del *Saccharomyces neoformans* mi ero convinto della sua grande importanza patogena. E ciò che io avevo dapprima supposto, fu ampiamente confermato dalle inoculazioni di questo saccaromicete nei cani.

Oggi non sono più solo a sostenere la importanza dei blastomiceti nella genesi dei tumori maligni, perchè osservatori degni di fede è ben noti nella scienza per importanti lavori hanno confermato quanto io aveva esposto nei miei precedenti lavori, riproducendo con colture pure di blastomiceti, ricavati da tumori maligni dell'uomo, neoplasie epiteliali e connettivali negli animali da esperimento.

Sono innanzi tutto da citare i lavori del Plimmer e del Leopold, due osservatori competenti nell'argomento; il primo perchè parecchi anni or sono si era occupato, insieme con Ruffer, delle forme parassitarie che si riscontrano in alcuni tumori maligni; il secondo perchè da anni aveva rivolta la sua attenzione allo studio della natura parassitaria dei tumori, facendo eseguire delle accurate ricerche al suo assistente, il dott. Rosenthal, sulla struttura del tessuto carcinomatoso e sulle inclusioni cellulari che vi si riscontrano. Questi lavori gli autori hanno pubblicato dopo uno studio di parecchi anni, usufruendo di un grandissimo numero di tumori umani ed eseguendo numerose ricerche sperimentali negli animali.

Il Plimmer (1) nel suo lavoro comparso nell'aprile del 1899 riferisce molto esattamente tutte le mie ricerche intorno all'argomento e mi difende dalle critiche di alcuni osservatori.

Furono esaminati dall'autore 1278 casi di cancro ed in 1130 furono trovati i parassiti liberi o nello interno delle cellule attive, mai in quelle degenerate.

L'analisi dei casi esaminati è sufficiente per dimostrare la costante relazione di questi corpi parassitari col cancro. I parassiti non furono trovati in ugual numero in tutti i cancri. In alcuni cancri a decorso rapido e che l'autore a ragione chiama acuti, furono riscontrati in grandissimo numero. Solamente nove del numero totale dei cancri esaminati erano di questa natura e presentavano quasi tutte le cellule con una o più forme parassitarie.

Secondo il Plimmer i tumori maligni a decorso rapido dipendono dalla diminuita resistenza dell'organismo o dalla aumentata virulenza del microrganismo, ovvero da tutte e due le condizioni.

In un caso di cancro a decorso rapido, nel quale con l'esame microscopico si vedevano numerosissimi parassiti, l'autore è riuscito ad ottenere una coltura di blastomicete. Il substrato di nutrizione che gli è servito per isolare questo microrganismo si componeva di un infuso di cancro, fatto nel modo che si fa il comune infuso di carne con aggiunta, dopo neutralizzazione, del 2 per cento di glucosio e dell'1 per cento di acido tartarico.

La coltura di questo blastomicete patogeno mi è stata gentilmente inviata dal Plimmer ed ho potuto constatare che per le proprietà culturali e morfologiche non si differenzia punto dal *Saccharomyces neoformans*.

Non si spiega veramente il riserbo espresso dal Plimmer nello stabilire la natura del parassita, riserbo che sembra egli si sia imposto per un male inteso riguardo verso il Metschnikoff, il quale, avendo molto leggiermente battezzato per coccidi i parassiti del cancro, ha fatto cadere in errore tutti gli osservatori che mi hanno preceduto.

I risultati sperimentali ottenuti dall'autore si dividono in tre gruppi: nel primo vi sono quelli negativi; nel secondo quelli in cui si ottenne la morte degli animali senza lesioni degli organi; nel terzo quelli in cui si ottenne la morte degli animali con neoproduzione di origine endoteliale.

Il reperto che l'autore descrive nelle cavie morte in seguito ad inoculazione del parassita in addome è perfettamente simile a quello che dà il *Saccharomyces neoformans*.

Il Plimmer è stato il primo a praticare le inoculazioni del blastomicete patogeno da lui isolato nell'epitelio corneale dei conigli ed ha osservato proliferazione delle cellule epiteliali e presenza dei parassiti nello interno delle cellule.

Le conclusioni cui è venuto l'autore sono le seguenti:

1° Nel cancro vi sono speciali corpi intracellulari che non appartengono a processi di degenerazione, che non si trovano in altri tessuti patologici e che si osservano alla parte periferica della neoplasia e non nelle parti degenerate;

2° Che vi sono dei casi rari di cancro nei quali questi corpi sono numerosissimi;

3° Che questi parassiti possono essere isolati e coltivati in substrati artificiali di nutrizione;

4° Che queste colture inoculate in alcuni animali producono la morte con produzione di tumori epiteliali e connettivali.

Queste conclusioni confermano pienamente quanto io avevo trovato e descritto intorno all'azione patogena dei blastomiceti.

Il fatto che lo stesso blastomicete patogeno nell'uomo ha dato origine ad

un tumore maligno di natura epiteliale e nella cavia ha prodotto una neoformazione di natura connettivale, era stato da me già osservato nelle ricerche sul potere patogeno del *Saccharomyces neoformans*, il quale inoculato nei cani può produrre neoformazioni epiteliali e neoformazioni connettivali.

Con un blastomicete patogeno isolato da un tumore maligno dell'uomo non si può certo sperare di riprodurre nelle cavie un cancro o un sarcoma, per la ragione che in questi animali i blastomiceti patogeni dànno luogo ad una infezione diffusa con produzione di neoformazioni, le quali sono molto ricche di parassiti e presentano una scarsa reazione da parte degli elementi cellulari.

Tra la infezione blastomicetica diffusa della cavia ed il tumore maligno dell'uomo vi è la stessa differenza che corre tra la tubercolosi polmonare dell'uomo e la tubercolosi diffusa della cavia, tra la polmonite nell'uomo e la setticoemia salivare del coniglio, tra l'actinomicosi nel mascellare del bue e la pseudotubercolosi diffusa della cavia, prodotta con la coltura di *Streptothrix* isolata dal tumore actinomicotico del bue.

La riproduzione del processo patologico simile a quello che si osserva nell'uomo non si potrà avere che negli animali suscettibili a contrarre tumori maligni per struttura e decorso simili a quelli dell'uomo, cioè a dire nel cane, nel bue, nel cavallo.

È perciò necessario, quando s'isola un blastomicete patogeno da un tumore maligno, prima di negare la sua importanza patogena, praticare numerose inoculazioni nei cani.

Non meno importante del lavoro del Plimmer è quello del Leopold (2), il quale ha studiato più centinaia di cancri, specialmente dell'utero, delle ovaie, delle tube, della vagina, degli organi genitali esterni, della mammella, del peritoneo, dell'omento. Furono esclusi i tumori ulcerati.

Piccoli pezzi di tumore raccolti con tutte le regole antisettiche furono osservati in liquidi sterilizzati sotto al campo del microscopio contenuto in un apparecchio speciale a temperatura da regolarsi esattamente mediante termoregolatore fatto costruire appositamente dall'autore.

Il materiale di ricerca non fu preso mai dalla parte superficiale del tumore, ma sempre dalla parte profonda o dalla parte centrale dei giovani noduli.

Fu data grande importanza alla ricerca microscopica di piccolissimi pezzi del tessuto carcinomatoso giovane in goccia pendente, alla temperatura di 37° C. per osservare dopo più tempo le modificazioni che presentavano le forme ritenute parassitarie.

Per le colture furono utilizzati quei pezzi di tumore osservati in gocce pendenti di liquidi nutritivi dimostratisi privi di comuni bacilli e cocchi. Come mezzi di nutrizione servirono il brodo sterile, il siero di sangue sterile, soluzioni di zucchero di uva, gelatina neutra ed acida, ecc.

Il Leopold condanna, come ho già fatto nei miei precedenti lavori, tutti quegli osservatori che si sono scagliati contro la teoria parassitaria dei tumori maligni, facendo solamente ricerche microscopiche e molto giustamente afferma che nulla si può concludere, senza praticare numerosi esperimenti col tessuto fresco e con le colture pure ottenute da questo.

Su venti carcinomi sottoposti allo esame culturale, quattro volte è riuscito al Leopold di ottenere colture pure di blastomiceti.

I casi nei quali si ottennero le culture sono i seguenti:

1° Carcinoma ovarico. Si fissarono sotto al campo del microscopio le forme parassitarie e si videro dopo qualche tempo moltiplicare per gemmazione. Si fecero trapianti in tre tubi di gelatina neutra e dopo alcuni giorni si ottenne lo sviluppo di una patina bianca composta di elementi rotondi a doppio contorno, simili perfettamente ai blastomiceti;

2° Carcinoma delle due ovaia. Con la stessa tecnica seguìta nel caso precedente si ebbe sulla superficie della gelatina lo sviluppo di un blastomicete sotto la forma di una patina bianca;

3° Carcinoma della mammella destra ed infiltrazione carcinomatosa delle glandole ascellari. Si ottenne con la stessa tecnica lo sviluppo di un blastomicete che formava patina bianca sulla superficie della gelatina;

4° Carcinoma port. vagin. uteri. Anche da questo caso si ottenne una coltura pura di blastomicete non dissimile dalle altre.

Con le inoculazioni di tessuto carcinomatoso negli animali, il Leopold ha ottenuto sopra quattro esperimenti due risultati positivi, riscontrando nel primo caso un tumore di natura sarcomatosa (sarcoma midollare) nella cavità addominale di un ratto. Nel secondo caso si riscontrò un tumore nella parte superiore della cavità addominale di un coniglio che rimase stazionario per alcuni mesi. Dopo quattro anni e cinque mesi l'animale morì ed alla sezione si vide che il fegato era cosparso di noduli grigiastri ed i polmoni presentavano noduli di varia grandezza. Tanto i noduli del fegato, quanto quelli del polmone, erano di natura epiteliale.

Inoculando nei ratti le colture pure del blastomicete isolato dal caso 2° (carcinoma dell'ovaio) il Leopold ho ottenuto tumori di struttura simile ai sarcomi a cellule giganti.

Le conclusioni che il Leopold trae dalle sue ricerche sono le seguenti:

1° Nei carcinomi delle ovaia con la osservazione microscopica si rinvengono blastomiceti.

2° Dal tessuto carcinomatoso fresco si ottengono colture pure di blastomiceti.

3° Queste colture pure inoculate nei testicoli di un ratto produssero un gran numero di noduli peritoneali di natura sarcomatosa.

4° Da questi noduli si ottennero di nuovo in coltura pura i blastomiceti.

Coi lavori dunque del Plimmer e del Leopold sono pienamente confermate le mie ricerche intorno alla importanza dei blastomiceti nella genesi dei tumori maligni.

Il Petersen e l'Exner (3) non hanno fatto altro che confermare le mie ricerche dimostrando che la inoculazione intraperitoneale dei blastomiceti patogeni produce nelle cavie alterazioni più considerevoli che non la inoculazione sottocutanea e che le neoformazioni prodotte sono dovute più allo accumulo dei parassiti anzichè alla proliferazione degli elementi cellulari.

È stato un errore degli autori il credere che con le inoculazioni di blastomiceti patogeni si potevano riprodurre nelle cavie dei cancri e dei sarcomi. Se almeno avessero letto quanto precedentemente era stato pubblicato intorno all'azione patogena dei blastomiceti nelle cavie, avrebbero saputo

un tumore maligno di natura epiteliale e nella cavia ha prodotto una neoformazione di natura connettivale, era stato da me già osservato nelle ricerche sul potere patogeno del *Saccharomyces neoformans*, il quale inoculato nei cani può produrre neoformazioni epiteliali e neoformazioni connettivali.

Con un blastomicete patogeno isolato da un tumore maligno dell'uomo non si può certo sperare di riprodurre nelle cavie un cancro o un sarcoma, per la ragione che in questi animali i blastomiceti patogeni dànno luogo ad una infezione diffusa con produzione di neoformazioni, le quali sono molto ricche di parassiti e presentano una scarsa reazione da parte degli elementi cellulari.

Tra la infezione blastomicetica diffusa della cavia ed il tumore maligno dell'uomo vi è la stessa differenza che corre tra la tubercolosi polmonare dell'uomo e la tubercolosi diffusa della cavia, tra la polmonite nell'uomo e la setticoemia salivare del coniglio, tra l'actinomicosi nel mascellare del bue e la pseudotubercolosi diffusa della cavia, prodotta con la coltura di *Streptothrix* isolata dal tumore actinomicotico del bue.

La riproduzione del processo patologico simile a quello che si osserva nell'uomo non si potrà avere che negli animali suscettibili a contrarre tumori maligni per struttura e decorso simili a quelli dell'uomo, cioè a dire nel cane, nel bue, nel cavallo.

È perciò necessario, quando s'isola un blastomicete patogeno da un tumore maligno, prima di negare la sua importanza patogena, praticare numerose inoculazioni nei cani.

Non meno importante del lavoro del Plimmer è quello del Leopold (2), il quale ha stúdiato più centinaia di cancri, specialmente dell'utero, delle ovaie, delle tube, della vagina, degli organi genitali esterni, della mammella, del peritoneo, dell'omento. Furono esclusi i tumori ulcerati.

Piccoli pezzi di tumore raccolti con tutte le regole antisettiche furono osservati in liquidi sterilizzati sotto al campo del microscopio contenuto in un apparecchio speciale a temperatura da regolarsi esattamente mediante termoregolatore fatto costruire appositamente dall'autore.

Il materiale di ricerca non fu preso mai dalla parte superficiale del tumore, ma sempre dalla parte profonda o dalla parte centrale dei giovani noduli.

Fu data grande importanza alla ricerca microscopica di piccolissimi pezzi del tessuto carcinomatoso giovane in goccia pendente, alla temperatura di 37° C. per osservare dopo più tempo le modificazioni che presentavano le forme ritenute parassitarie.

Per le colture furono utilizzati quei pezzi di tumore osservati in gocce pendenti di liquidi nutritivi dimostratisi privi di comuni bacilli e cocchi. Come mezzi di nutriziono servirono il brodo sterile, il siero di sangue sterile, soluzioni di zucchero di uva, gelatina neutra ed acida, ecc.

Il Leopold condanna, come ho già fatto nei miei precedenti lavori, tutti quegli osservatori che si sono scagliati contro la teoria parassitaria dei tumori maligni, facendo solamente ricerche microscopiche e molto giustamente afferma che nulla si può concludere, senza praticare numerosi esperimenti col tessuto fresco e con le coltnre pure ottenute da questo.

Su venti carcinomi sottoposti allo esame culturale, quattro volte è riuscito al Leopold di ottenere colture pure di blastomiceti.

I casi nei quali si ottennero le culture sono i seguenti:

1° Carcinoma ovarico. Si fissarono sotto al campo del microscopio le forme parassitarie e si videro dopo qualche tempo moltiplicare per gemmazione. Si fecero trapianti in tre tubi di gelatina neutra e dopo alcuni giorni si ottenne lo sviluppo di una patina bianca composta di elementi rotondi a doppio contorno, simili perfettamente ai blastomiceti;

2° Carcinoma delle due ovaia. Con la stessa tecnica seguìta nel caso precedente si ebbe sulla superficie della gelatina lo sviluppo di un blastomicete sotto la forma di una patina bianca;

3° Carcinoma della mammella destra ed infiltrazione carcinomatosa delle glandole ascellari. Si ottenne con la stessa tecnica lo sviluppo di un blastomicete che formava patina bianca sulla superficie della gelatina;

4° Carcinoma port. vagin. uteri. Anche da questo caso si ottenne una coltura pura di blastomicete non dissimile dalle altre.

Con le inoculazioni di tessuto carcinomatoso negli animali, il Leopold ha ottenuto sopra quattro esperimenti due risultati positivi, riscontrando nel primo caso un tumore di natura sarcomatosa (sarcoma midollare) nella cavità addominale di un ratto. Nel secondo caso si riscontrò un tumore nella parte superiore della cavità addominale di un coniglio che rimase stazionario per alcuni mesi. Dopo quattro anni e cinque mesi l'animale morì ed alla sezione si vide che il fegato era cosparso di noduli grigiastri ed i polmoni presentavano noduli di varia grandezza. Tanto i noduli del fegato, quanto quelli del polmone, erano di natura epiteliale.

Inoculando nei ratti le colture pure del blastomicete isolato dal caso 2° (carcinoma dell'ovaio) il Leopold ho ottenuto tumori di struttura simile ai sarcomi a cellule giganti.

Le conclusioni che il Leopold trae dalle sue ricerche sono le seguenti:

1° Nei carcinomi delle ovaia con la osservazione microscopica si rinvengono blastomiceti.

2° Dal tessuto carcinomatoso fresco si ottengono colture pure di blastomiceti.

3° Queste colture pure inoculate nei testicoli di un ratto produssero un gran numero di noduli peritoneali di natura sarcomatosa.

4° Da questi noduli si ottennero di nuovo in coltura pura i blastomiceti.

Coi lavori dunque del Plimmer e del Leopold sono pienamente confermate le mie ricerche intorno alla importanza dei blastomiceti nella genesi dei tumori maligni.

Il Petersen e l'Exner (3) non hanno fatto altro che confermare le mie ricerche dimostrando che la inoculazione intraperitoneale dei blastomiceti patogeni produce nelle cavie alterazioni più considerevoli che non la inoculazione sottocutanea e che le neoformazioni prodotte sono dovute più allo accumulo dei parassiti anzichè alla proliferazione degli elementi cellulari.

È stato un errore degli autori il credere che con le inoculazioni di blastomiceti patogeni si potevano riprodurre nelle cavie dei cancri e dei sarcomi. Se almeno avessero letto quanto precedentemente era stato pubblicato intorno all'azione patogena dei blastomiceti nelle cavie, avrebbero saputo

che nelle cavie finora nessuno ha potuto riprodurre tumori maligni con la inoculazione di blastomiceti patogeni.

Il Nichols (4) crede che i cancri da me prodotti nei cani con le inoculazioni di *Saccharomyces neoformans* non sieno il risultato della inoculazione, ma sieno dovuti a pura coincidenza.

Questa stessa obbiezione mi è stata mossa anche dal Baumgarten, ma senza alcun fondamento, perchè finora ho avuto parecchi casi positivi nei cani e se la coincidenza può sospettarsi per una o due volte, non può certo ammettersi da persone ragionevoli, quando la riproduzione del cancro con la inoculaziene del *Saccharomyces neoformans* è riuscita parecchie volte.

Nè d'altra parte si può credere che io abbia preso per cancri dei semplici granulomi, perchè osservatori competenti e degni di fede come il Plimmer ed il Leopold, lavorando indipendentemente da me, hanno riprodotto negli animali da esperimento tumori di natura epiteliale inoculando anche blastomiceti. Ora è impossibile ammettere che tre persone sieno cadute in un errore così grossolano.

Inoltre tra il manifestarsi di un processo patologico e la praticata inoculazione del parassita, fattore di tale processo, vi è tale un rapporto, come di effetto a causa, che manca se si tratta di pura coincidenza.

Il Nichols afferma che le forme parassitarie del cancro sono affatto diverse dai blastomiceti che si osservano nei tessuti delle cavie e dei conigli. Con ciò egli dimostra di non aver saputo trovare i veri parassiti del cancro e di aver preso per parassiti alcune forme di degenerazione cellulare che nulla hanno a che fare coi veri parassiti.

La identità tra i veri parassiti del cancro ed i blastomiceti inoculati negli animali è ammessa dal Plimmer, dal Leopold, dal Sawtchenko e da me, e non credo possa mettersi più in dubbio. Chi tale identità non ammette non ha saputo vedere i veri parassiti dei tumori maligni dell'uomo, e che così sia nel caso del Nichols è dimostrato alla evidenza dalle figure annesse al suo lavoro.

L'autore non crede che i blastomiceti sieno la causa del cancro, perchè avendo fatto colture da 13 casi, non ha avuto risultati positivi. Chi si è occupato con cura dell'argomento sa che non è cosa facile ottenere le colture. Al Plimmer che ha esaminato più di 1000 tumori non è riuscito che una sola volta coltivare i parassiti. Non fanno quindi nessuna meraviglia i risultati negativi del Nichols da un numero tanto esiguo di tumori.

Un altro lavoro più critico che originale sulle teorie parassitarie del cancro è quello del Borrel (5).

Secondo il Borrel tutte le forme parassitarie descritte dal Nils Sjobring, dal Soudakewitsch, dal Foà, dal Ruffer, dal Podwyssotzky e dal Sawtchenko sono da spiegare con la evoluzione atipica di un elemento della cellula cancerigna, la sfera di attrazione o meglio l'arcoplasma.

La spiegazione data dall'autore non ha ragione di essere perchè tutte le forme parassitarie da lui disegnate nelle tavole annesse al suo lavoro non hanno nulla a che fare coi veri parassiti del cancro.

Tutti gli osservatori che prima di me si sono occupati dei parassiti del cancro e li hanno descritti come coccidi, nella smania di trovare nell'interno delle cellule qualche cosa che ricordasse le forme dei protozoi, hanno descritto e figurato, insieme coi veri parassiti, inclusioni e degenerazioni cellulari. Sono

appunto questi pseudoparassiti che il Borrel ha preso in considerazione nel suo lavoro, lasciando da parte le vere forme parassitarie.

La prima obbiezione che il Borrel fa alla teoria blastomicetica è che le diverse varietà d'inclusioni non possono essere considerate come blastomiceti e che, se vi sono blastomiceti nei cancri, essi non si trovano certamente nelle cellule epiteliali.

Sono completamente della opinione dell'autore nello ammettere che le inclusioni da lui descritte e figurate non sono blastomiceti, ma degenerazioni cellulari che non hanno nulla a che fare coi veri parassiti.

Quanto alla affermazione aprioristica che i blastomiceti non possono penetrare nello interno delle cellule epiteliali, basta citare le osservazioni del Plimmer e del Leopold che, confermando le mie ricerche, hanno osservato veri parassiti nell'interno delle cellule epiteliali. Per convincersi del fatto il Borrel avrebbe dovuto praticare delle inoculazioni sull'epitelio corneale del coniglio o del cane ed allora avrebbe veduto molti blastomiceti nell'interno delle cellule epiteliali proliferate.

L'altra obbiezione del Borrel sta nel fatto che non si ottengono colture di blastomiceti dai tumori, quando si opera con tutte le regole antisettiche ed a questo proposito egli cita le ricerche del Maffucci e del Sirleo, i quali qualche volta hanno ottenuto colture di blastomiceti, ma le hanno considerate come accidentali, perchè delle piastre di controllo esposte nel medesimo tempo all'aria del laboratorio presentavano anche colonie di blastomiceti.

L'autore si limita a riferire i risultati negativi del Maffucci e del Sirleo, perchè favorevoli alla sua tesi, e dimentica i risultati positivi del Plimmer e del Leopold, due osservatori altrettanto valenti quanto i due primi.

Il Gaylord (6) in un lavoro pubblicato nello scorso anno riferisce di avere raccolto asetticamente il liquido della cavità addominale di un individuo colpito da adenocarcinoma dell'appendice vermiforme e di aver fatto inoculazioni in alcuni animali. Tra questi una cavia inoculata in vena giugulare ed uccisa dopo qualche tempo presentò noduli di natura epiteliale nei polmoni.

L'autore non avendo potuto ottenere colture di blastomiceti ed avendo trovato una certa somiglianza delle forme parassitarie endocellulari con quelle descritte dal Guarnieri nell'epitelio corneale del coniglio afferma che i parassiti del cancro appartengono ai protozoi.

Da quanto il Gaylord scrive e dalle figure annesse al lavoro appare chiaro che egli ha preso per parassiti alcune forme di degenerazioni cellulari.

Gli esperimenti fatti dall'autore sono troppo scarsi per autorizzarlo a trarre delle conclusioni.

Lo Sternberg (7) recentemente ha pubblicato una serie di ricerche sperimentali su alcuni oidii e su alcuni blastomiceti patogeni isolati dal Busse, dal Curtis, dal Leopold e da me.

L'autore riconosce giustissima la separazione prima da me consigliata e poi seguita dal Cao e dal Carnevali del gruppo degli oidii da quello dei blastomiceti propriamente detti.

Il blastomicete patogeno più importante sul quale l'autore ha fatto ricerche è quello acquistato dal Kral e che io isolai da un adenocarcinoma dell'ovaio.

Col blastomicete patogeno da me isolato lo Sternberg ha fatto parecchie inoculazioni endovenose nei cani ed una sola inoculazione nelle mammelle. Nei cani uccisi o morti in seguito alla inoculazione endovenosa ha riscontrato tutte le lesioni da me descritte e figurate. Nella cagna inoculata nelle mammelle non ha osservato nulla di speciale.

Siamo discordi nella interpretazione delle neoformazioni prodotte nei cani con le inoculazioni endovenose del blastomicete patogeno. Quantunque l'autore affermi che i gruppi di cellule epitelioidi neoformate hanno l'aspetto di un vero tumore, finisce col conchiudere che si tratta di un tessuto di granulazione. Lo Sternberg non porta alcuna buona ragione per negare quanto io ho affermato nei miei precedenti lavori che cioè si tratta di neoformazioni connettivali da paragonarsi alle metastasi che avvengono nell'uomo in seguito allo sviluppo di un sarcoma. Già in altro lavoro paragonai le lesioni osservate nei cani morti in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti patogeni alle lesioni riscontrate dal Busse negli organi della donna morta in seguito allo sviluppo di un sarcoma molle della tibia, e lo stesso Busse non ha potuto negare la esattezza della mia affermazione.

Dal risultato negativo di una sola inoculazione nelle mammelle di una cagna col blastomicete patogeno da me isolato l'autore non era veramente autorizzato a conchiudere che i blastomiceti non sono capaci di produrre tumori epiteliali. Egli spiega, come hanno fatto altri, i casi positivi da me ottenuti con l'ammettere che si tratta di pura coincidenza.

Siccome nella mia quinta memoria affermai che sopra 59 cani inoculati avevo ottenuto tre risultati positivi, lo Sternberg fa presto a paragonare questo numero di tumori con quello osservato dal Casper e dal Johne ed a conchiudere che essendo il numero delle neoplasie da me prodotto uguale a quello che si osserva nei cani senza alcuna inoculazione di blastomiceti, i miei risultati positivi devono ritenersi come accidentali.

Lo Sternberg però ignora che sul numero totale di 59 cani sottoposti ad esperimento fino al 1898 bisogna toglierne quelli che furono inoculati in vena giugulare. La percentuale allora dei risultati positivi da me ottenuti sale al 10.3 ed è superiore di molto a quelle osservate dal Casper (4.7 %) e dal Johne (5.8 %) (1).

Altri osservatori si sono occupati di ricercare i *blastomiceti in lesioni patologiche diverse dai tumori maligni.*

Lavori sperimentali fatti molto accuratamente sono quelli del Gilchrist (8) il quale da solo ed insieme con Royal Stokes ha trovato i blastomiceti in alcune affezioni cutanee dell'uomo che si presentavano coi caratteri di affezioni lupose ed ha potuto isolare i parassiti in coltura pura.

Certo è molto importante che in processi d'infiammazione cronica della cute, caratterizzati da infiltrazione parvicellulare del corion, si sieno trovati e coltivati dei blastomiceti capaci anche di produrre delle alterazioni negli animali da esperimento.

Le osservazioni del Gilchrist in parte confermano le osservazioni del Gonella (9) e del Guarnieri (10) che hanno riscontrato blastomiceti nella

---

(1) Le percentuali di Casper e Johne comprendono i carcinomi ed i sarcomi.

congiuntivite tracomatosa, del Secchi (11) il quale li ha descritti nell'acne cheloide, del De Simoni (12) che li ha veduti nelle tonsille ipertrofiche, del Mazza (13) il quale recentemente ha trovato gran numero di blastomiceti nel rinoscleroma. Tutte queste ultime ricerche non hanno gran valore, perchè non sono accompagnate dagli esperimenti d'inoculazione dei blastomiceti e di riproduzione dei processi patologici, nei quali con la sola ricerca microscopica sono state vedute forme blastomicetiche.

***

In questi ultimi anni ho continuato ad occuparmi dell'azione patogena dei blastomiceti in rapporto alla genesi dei tumori maligni, limitandomi allo studio di un blastomicete, il *Saccharomyces neoformans*, il quale dalle prime inoculazioni praticate nei cani mi aveva dato molto a sperare.

Per dimostrare la etiologia dei tumori maligni si potevano seguire due vie, quella diretta, inoculando tumori maligni dell'uomo o le colture di blastomiceti da essi ottenute negli animali suscettibili, e quella indiretta, cercando di isolare dallo ambiente i blastomiceti ed inocularli negli animali. Da principio ho seguìto l'una e l'altra via, ma ben presto mi sono accorto che era molto difficile ottenere risultati positivi seguendo la prima.

Seguendo la via indiretta bisognava innanzi tutto dimostrare che, inoculando colture pure di *Saccharomyces neoformans* negli animali suscettibili a contrarre tumori maligni, si riproducevano le forme libere ed endocellulari descritte dagli osservatori, come appartenenti ai coccidi e le forme libere ed endocellulari descritte dal Russell col nome di corpuscoli a fucsina.

In secondo luogo bisognava dimostrare che i blastomiceti, inoculati in coltura pura negli stessi animali, sono capaci di produrre delle neoplasie per decorso e struttura perfettamente identiche a quelle che si osservano nell'uomo.

Se io sia riuscito a dimostrare questi fatti, si vedrà nel presente lavoro.

II.

Inoculazioni dei blastomiceti nell'epitelio corneale dei cani.

Queste inoculazioni ho fatto allo scopo di seguire l'azione che i parassiti sono capaci di esercitare sulle cellule dell'epitelio corneale.

Simili ricerche sono state fatte la prima volta dal Plimmer nei conigli ed hanno dato per risultato la proliferazione delle cellule epiteliali e la presenza di blastomiceti nello interno di queste cellule.

Io ho voluto studiare da una parte il destino dei parassiti, dall'altra la proliferazione epiteliale.

I blastomiceti patogeni inoculati nell'epitelio corneale dei cani sono capaci di determinare tale una proliferazione delle cellule epiteliali che con ragione può meritare il nome di neoformazione.

Esperimenti di controllo fatti con mezzi meccanici, fisici e chimici sull'epitelio corneale dei cani non hanno mai dato luogo ad una neoformazione delle cellule epiteliali quale si è osservata dopo la inoculazione dei blastomiceti patogeni.

Ho avuto anche la cura di praticare numerose inoculazioni con colture pure di blastomiceti non patogeni e non ho osservato alcuna proliferazione delle cellule epiteliali. Per questa ragione lo innesto corneale dei blastomiceti ha grande importanza per decidere la quistione, se trattasi di blastomiceti patogeni oppur no.

Fatte numerose scarificazioni sull'epitelio corneale, deponevo con l'ago di platino un po' della patina colturale presa da una coltura su patata.

Ho tolto le cornee ai cani dopo dieci, venti giorni, un mese, due mesi, tre mesi. Appena enucleato il bulbo, avevo cura di lavarlo ripetutamente in acqua per togliere ogni traccia di sangue o di sudiciume che potesse essere deposto sulla cornea; poi con cura toglieva intera la cornea e la fissavo o in sublimato acetico o in alcool assoluto.

Come liquidi coloranti ho usato indifferentemente la ematossilina iodica ovvero il violetto di genziana ed il paracarminio.

Le colorazioni *in toto* con la ematossilina mi hanno dato ottimi risultati. I parassiti si possono facilmente riconoscere anche da un occhio poco esercitato, perchè assumono una colorazione affatto diversa dagli elementi del tessuto.

Le sezioni in parte sono state fatte perpendicolarmente alla superficie della cornea, in parte tangenzialmente. Macroscopicamente nei primi giorni dopo praticata la inoculazione si osserva un leggiero opacamento della cornea che nei giorni consecutivi va aumentando, fino a che compare un ispessimento di colore bianchiccio che permane a lungo. Questo ispessimento dell'epitelio non è regolare in tutta la sua estensione, ma dove è più e dove meno pronunziato.

Ho conservato in vita parecchi cani nei quali avevo praticato lo innesto corneale e mai ho veduto scomparire l'ispessimento epiteliale formatosi, che è rimasto sempre limitato senza produrre alcun disturbo generale.

Dallo studio delle sezioni ho potuto vedere che in un primo

tempo i parassiti parte si localizzano nel protoplasma delle cellule epiteliali, parte penetrano al disotto dell'epitelio ed in massima parte sono inglobati dai leucociti.

In un secondo tempo, dopo circa venti giorni dalla praticata inoculazione, avviene una diminuzione nel numero dei parassiti e comincia la proliferazione delle cellule epiteliali.

Molto interessante è lo studio delle forme parassitarie che si trovano nel protoplasma cellulare. Si possono distinguere in forme giovani, adulte e vecchie. Tutti questi parassiti endocellulari hanno il carattere comune di scavarsi una nicchia nel protoplasma cellulare, sicchè appaiono circondati da un alone chiaro.

Le forme giovani più piccole o si presentano omogeneamente ed intensamente colorate ovvero presentano una parte centrale più intensamente colorata ed una parte periferica meno intensamente colorata.

Le forme adulte o sono omogeneamente colorate, alle volte provviste di membrana ialina ovvero presentano la sostanza cromatica limitata alla periferia in forma di cercine o al centro in forma di granulo.

Le forme vecchie hanno scarsa sostanza cromatica ovvero non ne presentano punto ed allora appaiono come cercini ialini.

Spesso in una stessa cellula epiteliale vi sono più forme parassitarie.

Nel tessuto sottoepiteliale si vedono forme endocellulari e libere, che presentano le medesime particolarità di struttura, di cui si è detto innanzi.

Nel protoplasma delle cellule epiteliali si osservano pure dei leucociti che si possono facilmente distinguere dalle forme parassitarie, perchè si colorano in violetto, mentre i parassiti prendono un colorito marrone scuro e perchè presentano una disposizione della sostanza cromatica affatto diversa da quella dei parassiti.

Le cellule epiteliali corneali non presentano altra alterazione oltre la vacuolizzazione del protoplasma prodotta dai parassiti.

Quando i parassiti sono diminuiti, incomincia la proliferazione dell'epitelio. Si verifica allora una disorientazione degli elementi cellulari in guisa che o si formano dei cordoni che si approfondano nel tessuto sottoepiteliale, ovvero si formano dei nidi o globi cellulari, simili a quelli che si osservano in alcuni epiteliomi.

Sul modo come avviene la disorientazione delle cellule epiteliali è facile persuadersi tanto nelle sezioni perpendicolari alla superficie della cornea, quanto in quelle tangenziali.

Quanto più progredisce la neoformazione epiteliale, tanto più diminuisce il numero dei parassiti. Questo fatto già da me osservato nei cani, nei gatti e nelle cavie morte in seguito ad inoculazione endovenosa del *Saccharomyces neoformans*, si vede ancora meglio nelle neoformazioni dell'epitelio corneale.

Quanto alla denominazione delle neoformazioni epiteliali determinate nei cani con lo innesto corneale dei blastomiceti patogeni non è cosa facile pronunziarsi.

Sono stati descritti parecchi casi di papilloma ed epitelioma della cornea e se si legge la descrizione degli epiteliomi della cornea osservati nell'uomo si trova che può applicarsi alle neoformazioni sperimentali innanzi descritte.

III.

Inoculazione dei blastomiceti negli organi.

Quantunque le inoculazioni dei blastomiceti patogeni negli organi dei cani (mammella-testicolo) dieno risultati positivi meno frequenti delle inoculazioni endovenose, pure la percentuale di 8. 4 (1) da me ottenuta è di molto superiore a quella osservata dal Casper e dal Johne. La percentuale di carcinomi osservata dal Casper nei cani è di 1. 9 e quella osservata dal Johne è di 3. Cadono quindi tutte le obbiezioni di quegli osservatori, i quali hanno voluto spiegare i risultati positivi da me ottenuti come pure coincidenze.

Il primo dei risultati positivi l'ho osservato in una cagna e la lesione prodotta è stata da me descritta nella memoria terza (14). In questo primo caso affermai trattarsi di un processo neoplastico, ma non mi pronunziai nella denominazione del tumore, perchè questo non presentava la struttura tipica dei tumori epiteliali, nè quella dei tumori connettivali.

Oggi, dopo aver fatte molte altre inoculazioni nei cani e dopo avere compresa meglio l'azione patogena che il *Saccharomyces neoformans* esercita su di essi, posso spiegare meglio, come farò in seguito, la genesi della lesione osservata in questa cagna.

---

(1) I cani inoculati negli organi fino al 1898 furono 29 e quelli inoculati nello stesso modo fino al 1901 furono 30.

Il secondo risultato positivo l'ho avuto in una cagna inoculata nelle due mammelle posteriori con colture pure di *Saccharomyces neoformans* già passata attraverso l'organismo del cane.

Nei primi giorni dopo la inoculazione fatta nel modo solito, prendendo cioè con l'ago di platino un po' della patina culturale, facendone emulsione in acqua sterile ed inoculandone una piccola parte con una delle comuni siringhe, l'animale presentò una leggiera reazione nel sito d'inoculazione, con leggiera tumefazione delle mammelle.

Dopo alcuni giorni scomparvero del tutto i sintomi di questa reazione e le mammelle apparvero del tutto normali. Fu dopo un mese e qualche giorno che si cominciò ad osservare che le mammelle erano alquanto ingrossate.

Con la evoluzione del tumore, specialmente verso gli ultimi mesi, si osservò un considerevole dimagramento.

L'animale morì dopo 10 mesi ed alla autopsia furono constatate le seguenti alterazioni: la mammella posteriore destra presenta la grandezza di un mezzo uovo ed è molto consistente alla palpazione; la mammella posteriore sinistra è poco più piccola di un mezzo uovo ed è ugualmente dura alla palpazione; la cute che ricopre le due mammelle è in alcuni punti molto aderente da non potersi sollevare in pieghe. Le glandole inguinali d'ambo i lati sono molto ingrossate, le più grandi raggiungono la grandezza di una mandorla, le più piccole quella di una nocciuola; numerose sono le glandole comprese in mezzo al tessuto cellulo-adiposo dell'inguine.

Nello addome le glandole linfatiche sono alquanto ingrossate; nessuna alterazione si osserva nel fegato, nella milza e nei reni; neanche nella cavità toracica e cranica si notano alterazioni.

I numerosi tentativi di coltura riuscirono negativi, tanto dai tumori principali, quanto dalle numerose glandole linfatiche.

Nelle sezioni delle parti centrali dei tumori (Fig. 1) si osservano una serie di tubuli epiteliali tagliati in varia direzione, sostenuti da un tessuto connettivo spesso, con nuclei piuttosto scarsi.

Questi tubuli epiteliali per la loro struttura e per la loro disposizione ripetono il tipo della glandola mammaria normale.

La parte periferica del tumore (Fig. 2) presenta una struttura alquanto diversa dalla parte centrale. Mentre le cellule epiteliali che rivestono i tubuli della parte centrale sono basse, quasi pavimentose, quelle che rivestono i tubuli della parte periferica sono cellule cilindriche alte. Inoltre mentre nelle parti centrali dei tumori il connettivo è abbondante e tende quasi a strozzare le neoformazioni epiteliali, nelle parti periferiche è molto scarso.

Le glandole linfatiche inguinali sono trasformate in un tessuto neoformato simile a quello che si osserva nella parte periferica dei tumori principali. Ritroviamo quindi nelle glandole linfatiche gli stessi elementi epiteliali che costituiscono il tumore principale e quindi si può parlare di vere metastasi glandolari. Alcune delle glandole linfatiche non sono del tutto invase dalla neoformazione e fanno vedere in mezzo al tessuto proprio della glandola linfatica normale dei tubuli epiteliali (Fig. 3). Questi tubuli epiteliali riscontrati nelle glandole linfatiche sono veri trapianti avvenuti attraverso

le vie linfatiche, tanto vero che nelle molte sezioni fatte del connettivo cellulo-adiposo che circondava il tumore, ho potuto seguire il tragitto delle cellule epiteliali.

Dalla descrizione data appare chiaro che si tratta di un adeno-carcinoma della glandola mammaria.

Nella parte centrale del tumore non mi è riuscito di riscontrare forme parassitarie. Solamente nella parte giovane del tumore e nelle metastasi glandolari ho veduto forme parassitarie libere ed endo-cellulari, sotto la forma di corpuscoli a fucsina.

Questo reperto parassitario spiega il risultato negativo delle colture. Come vedremo in seguito, quando i blastomiceti si presentano nei tessuti con la forma tipica dei corpuscoli a fucsina, descritti dal Russell, non sono più coltivabili. È noto che nei tumori dell'uomo a lungo decorso i blastomiceti si presentano sempre sotto la forma di corpuscoli di Russell ed è perciò impossibile in questi casi ottenere in coltura i parassiti.

Il terzo caso positivo l'ho osservato in un cane che fu inoculato nei due testicoli con coltura pura di *Saccharomyces neoformans*.

Nei primi giorni dopo la inoculazione si osservò una leggera tumefazione dei testicoli che scomparve verso il quindicesimo giorno. Dopo più di un mese dalla praticata inoculazione i testicoli erano alquanto ingrossati, ed alla palpazione apparivano di consistenza aumentata. La tumefazione dei testicoli andò lentamente aumentando, e dopo tre mesi dalla praticata inoculazione, oltre al tumore principale, si potevano constatare con la palpazione noduli grandi quanto nocciuole lungo il pene. Al quinto mese al posto dei due testicoli si osservava una massa unica, dura, bernoccoluta; un poco più in alto si toccava un nodulo grande, quanto una grossa nocciuola, sormontato da un altro tumore di forma irregolare. Cercando di aprire l'orifizio prepuziale faceva sporgenza un'altra massa neoplastica, di forma conica, con la base in basso e con l'apice in alto, la quale nascondeva la estremità del pene e per la sua conformazione facilmente si poteva scambiare con questa.

Verso la fine del quinto mese l'animale morì improvvisamente. L'autopsia fu fatta immediatamente dopo la morte con l'assistenza del collega professore Carbone di anatomia patologica, il quale già aveva osservato l'animale in vita.

Tolta la cute che ricopriva il tumore al posto dei testicoli si osserva una massa di tessuto neoformato, di colore bianco-gialliccio, ed intorno al pene si vedono numerosi noduli dello stesso aspetto della massa principale del tumore, alcuni grandi quanto una nocciuola, altri quanto piselli; intorno alla estremità del pene vi è una massa neoplastica conica.

Le glandole linfatiche inguinali sono poco ingrossate.

Nessuna alterazione si osserva negli organi.

I tentativi di coltura dei parassiti dalla massa principale del tumore

e dai noduli secondari non diedero risultato positivo. Risultati negativi diedero anche le colture fatte dagli organi.

Le sezioni del tumore principale osservate al microscopio fanno vedere delle cellule, strettamente ravvicinate le une alle altre, disposte in modo da costituire dei cordoni che in alcune sezioni sono tagliati longitudinalmente, in altre trasversalmente.

Questi cordoni cellulari sono separati da un connettivo lasso. Molte cellule sono in via di riproduzione per divisione indiretta. La medesima struttura presentano i noduli secondari grandi e piccoli.

In tutte le sezioni del tumore non ho riscontrato fasi degenerative.

Quando in un precedente lavoro (15) descrissi il tumore prodotto in questo cane con la inoculazione del *Saccharomyces neoformans*, mi pronunziai per la diagnosi di adeno-carcinoma, perchè le sezioni osservate al microscopio presentavano una struttura tubulare che ricordava un testicolo giovane.

In seguito, avendo avuto la opportunità di studiare un altro tumore simile con la inoculazione dello stesso blastomicete patogeno ho modificato la diagnosi.

Quando appresso descriverò questo altro tumore, dirò della sua origine e della sua natura.

Chi ha lunga pratica dello studio istologico dei tumori del testicolo, sa quanta difficoltà presenta la loro diagnosi.

I parassiti osservati in questo terzo caso sono più numerosi di quelli osservati nel secondo tumore sperimentale e si presentano tutti sotto l'aspetto tipico di corpuscoli a fucsina, alcuni liberi e disposti a gruppi, altri endocellulari.

Nessuna alterazione degna di nota fu osservata nelle sezioni degli organi.

Il quarto caso di tumore fu osservato in una cagna inoculata nella mammella posteriore destra con coltura pura di *Saccharomyces neoformans*.

Parecchi giorni dopo la inoculazione si constatò la presenza di un indurimento nel sito d'inoculazione, e dopo due mesi e mezzo il tumore aveva raggiunto la grandezza di una castagna.

Dopo circa cinque mesi dalla inoculazione l'animale fu osservato dal collega di anatomia patologica, prof. Cesaris Demel.

Dopo sette mesi e mezzo dalla inoculazione l'animale morì in preda a notevole cachessia e ne fu fatta immediatamente la sezione.

La cute è fissata fortemente sul tumore e non si lascia sollevare in pieghe.

Le glandole linfatiche in vicinanza del tumore sono leggermente ingrossate. Non si nota alcuna alterazione negli organi.

Il tumore presenta nelle sezioni la medesima struttura di quello descritto nel secondo caso, e perciò fu fatta diagnosi di adeno-carcinoma.

I parassiti liberi ed endocellulari si presentavano sotto la forma tipica di corpuscoli a fucsina. Le colture fatte con diversi pezzi presi dalla periferia del tumore non diedero risultato positivo.

Il quinto tumore fu osservato in un cane inoculato nei testicoli con coltura pura di *Saccharomyces neoformans*.

Dopo circa un mese in corrispondenza del pene si notavano dei noduli consistenti, spostabili. Nei testicoli non si osservava nulla di anormale.

Al quarto mese dalla inoculazione il cane morì in preda a notevole dimagramento. La sezione fu fatta appena dopo la morte.

Il tumore si componeva di più noduli di varia grandezza aventi sede nel connettivo sottocutaneo del prepuzio. I noduli più grandi nella superficie che guardava il pene, erano ulcerati. Nessuna alterazione presentavano i testicoli e la prostata.

Le glandole linfatiche inguinali erano alquanto ingrossate.

Alla superficie dei reni si notavano dei noduli, al numero di quattro nel destro, al numero di tre nel sinistro, poco sporgenti sulla superficie, di colorito bianco-gialliccio, occupanti nella sezione longitudinale dell'organo buona parte della sostanza corticale. Nella milza si osservavano due noduli grandi quanto piselli, sporgenti sulla superficie convessa. Nessuna alterazione si notò negli altri organi.

Le colture fatte dal tumore e dagli organi non diedero risultato positivo.

Il tumore si è originato nel connettivo del prepuzio perchè ivi è stata fatta la inoculazione del parassita invece che nei testicoli. Lo stesso accadde nel terzo caso, con la differenza che il tumore, essendo di volume maggiore aveva prodotto per compressione l'atrofia dei testicoli. Lo stesso si sarebbe verificato in questo quinto caso, se l'animale fosse ancora vissuto.

Nelle sezioni del tumore osservate al microscopio si nota la stessa struttura innanzi descritta nel terzo caso.

I parassiti si presentano sotto la forma di corpuscoli di Russell.

Le neoformazioni che si vedono nel rene sono costituite dalle stesse cellule di origine mesodermale che costituiscono il tumore principale. Lo stesso deve dirsi dei noduli esistenti nella milza. Anche nei noduli dei reni e della milza vi sono parassiti sotto la forma di corpuscoli di Russell.

Questo tumore per decorso e per struttura è perfettamante identico al primo ed al terzo. Il primo tumore che descrissi in un lavoro precedente (16) fu prodotto dalla inoculazione del *Saccharomyces neoformans* nelle due mammelle posteriori di una cagna. Si svilupparono tumori connettivali nelle due mammelle e noduli nei reni similmente come nell'ultimo caso.

Si deduce quindi che con le inoculazioni dei blastomiceti patogeni negli organi dei cani si possono sviluppare tumori connettivali e tumori epiteliali.

***

L'azione patogena del *Saccharomyces neoformans* è stata studiata anche nei gatti. Di quelli inoculati nel connettivo sottocutaneo alcuni hanno presentato un nodulo nel sito d'inoculazione che, aperto dopo qualche tempo, ha mostrato contenere una sostanza gialliccia, cremosa, contenente leucociti, cellule giganti, detritus calcareo e forme parassitarie del solito aspetto; altri non hanno presentato alcuna lesione.

I gatti inoculati nei testicoli e nelle mammelle neanche hanno presentato lesioni.

Nei gatti inoculati in addome e morti dopo qualche mese, le glandole inguinali ed ascellari erano molto ingrossate; anche ingrossate erano le glandole linfatiche addominali; la milza era ingrandita e mostrava sporgenti sulla superficie i follicoli; nei reni si osservavano dei noduli, di colorito bianco-giallicci; gli stessi noduli si sono osservati alle volte anche nei polmoni; negli altri organi nessuna alterazione.

Con l'esame microscopico a fresco si è constatata la presenza di parassiti solamente nelle glandole linfatiche, nella milza e nel midollo delle ossa. In questi preparati i parassiti si presentavano sotto la forma di globi ialini, riuniti a gruppi, della stessa rifrangenza delle goccioline adipose.

Le colture fatte dagli organi che presentavano lesioni, non hanno dato luogo a sviluppo di parassiti.

Le lesioni degli organi osservate al microscopio appaiono di natura connettivale e sono costituite da cellule epitelioidi simili a quelle che abbiamo riscontrate nei reni del quinto cane, inoculato in prossimità dei testicoli con *Saccharomyces neoformans*.

Nelle sezioni colorate col carminio e col violetto di genziana i parassiti si riscontrano sotto l'aspetto tipico di corpuscoli a fucsina nei cordoni follicolari delle glandole linfatiche e della milza, tra gli elementi linfoidi proliferati del midollo delle ossa, nei noduli dei reni e dei polmoni e sono liberi ed endocellulari. Tale reperto parassitario spiega l'esito negativo delle colture.

Come vedremo in seguito, quando i blastomiceti si presentano sotto la forma di corpuscoli a fucsina, non sono più coltivabili. La ragione della trasformazione dei blastomiceti in corpuscoli fucsinofili risiede nelle proprietà acquistate dal siero di sangue degli animali inoculati, di cui dirò in seguito.

Le pecore inoculate nello addome, nel connettivo sottocutaneo e nelle mammelle non hanno presentato alcuna lesione degna di nota.

***

Da tutte le ricerche innanzi riferite abbiamo acquistato una esatta conoscenza delle forme che i blastomiceti presentano nei tessuti degli animali da esperimento. Queste forme, che sono perfettamente simili a quelle che si riscontrano nei tumori maligni dell'uomo, si possono distinguere in quelle capsulate ed in quelle apparentemente sprovviste di capsule. Nelle prime bisogna considerare la diversa forma della capsula e la diversa disposizione del contenuto protoplasmatico; nelle seconde è da considerare solamente il modo come è disposta la sostanza protoplasmatica, che si colora intensamente coi colori di anilina.

Considerando innanzi tutto la capsula, è da notare che può essere costituita da una o più membrane. La membrana interna, quella che circonda il corpo protoplasmatico del parassita, veduta nei preparati a fresco, appare rifrangente e più o meno spessa. Nei preparati colorati questa membrana rifrangente si colora intensamente coi colori di anilina. Alle volte allo esterno di questa membrana rifrangente ve ne è un'altra più o meno spessa, ialina, la quale è un prodotto di secrezione della membrana interna rifrangente.

La membrana ialina si può facilmente fare comparire in quei blastomiceti che hanno la sola membrana rifrangente, facendo agire su di essi deboli soluzioni acide. A mano a mano che la soluzione acida esercita la sua azione, si vede comparire allo esterno della membrana rifrangente un alone ialino che ingrandisce sempre di più a spese della membrana rifrangente che diventa meno spessa.

Nella spessa membrana ialina alle volte si formano uno, due o più ispessimenti di sostanza fortemente rifrangente la luce, simile a quella che costituisce la membrana interna rifrangente, e si hanno allora quelle forme blastomicetiche ad anelli concentrici, descritte dal Soudakewitch nei cancri e da me riprodotte nei tessuti degli animali con le inoculazioni del *Saccharomyces neoformans.*

Per la formazione della membrana esterna ialina la membrana rifrangente si può ridurre di molto in spessezza, sino a scomparire del tutto.

Nelle forme capsulate il contenuto protoplasmatico o manca del tutto (forme degenerate, involutive) o è scarso e distribuito omogeneamente in tutto il corpo del parassita o è in forma di uno o più granuli o di segmenti periferici, addossati alla membrana rifrangente, o del tutto uniforme ed intensamente colorato. In questo

ultimo caso il contenuto protoplasmatico si confonde con la membrana rifrangente.

Nelle forme blastomicetiche non capsulate il contenuto protoplosmatico si presenta nello stesso modo.

Ai blastomiceti endocellulari o liberi, con contenuto protoplasmatico intensamente ed omogeneamente colorato, con o senza membrana ialiana, disposti a gruppi di due a trenta, il Russell, parecchi anni or sono, diede il nome di corpuscoli a fucsina.

Non si possono confondere i parassiti endocellulari con le inclusioni cellulari.

Se un leucocito penetra nello interno di una cellula epiteliale neoformata, si circonda di un alone chiaro che dapprima piccolo, va poi ingrandendo, fino ad assumere l'aspetto di un grosso vacuolo.

Da principio il leucocito conserva la sua forma normale, ma in seguito va incontro ad un processo di disfacimento, per cui si riduce di molto il corpo cellulare ed il nucleo assume la forma vescicolare. Il leucocito poi continua a disfarsi ed il nucleo si trasforma in un gruppo di granuli giacenti in un residuo del protoplasma cellulare. Può anche scomparire tutta la sostanza cromatica del nucleo ed allora nello interno del grosso vacuolo non si osserva che un residuo del protoplasma cellulare, variamente conformato.

Quando il leucocito è da poco penetrato nello interno di una cellula, non può certo confondersi con un parassita. Ma quando si è ridotto di molto il protoplasma cellulare ed è avvenuta la fusione della sostanza cromatica del nucleo in un globulo giacente nel centro del residuo protoplasmatico del corpo cellulare, un occhio poco esercitato potrebbe confondere questa inclusione cellulare con un parassita giovane, intensamente colorato, circondato da membrana ialina. Facendo però bene attenzione si vede che queste inclusioni cellulari non hanno quella forma regolare che presentano i parassiti.

Neanche si possono confondere coi parassiti endocellulari alcune *degenerazioni che avvengono nel protoplasma delle cellule neoformate.*

Innanzi tutto è da notare che queste forme di degenerazione cellulare non si colorano mai col violetto di genziana, seguendo il metodo di doppia colorazione da me proposto.

Appaiono queste forme di degenerazione come chiazze ialine di diversa forma, con o senza contenuto debolmente colorato. Le chiazze ialine senza contenuto possono essere uniche e multiple, piccole e grandi. Quando sono multiple, possono essere distanti le une dalle altre o strettamente ravvicinate.

Le chiazze ialine non sono mai separate per mezzo di una capsula dal pratoplasma cellulare.

Interessante è anche lo studio delle chiazze ialine con contenuto, che può essere in forma di uno o più granuli ovvero di una massa debolmente colorata, provveduta qualche volta di prolungamenti. Alcune degenerazioni ialine, contenenti un granulo al centro, sono state descritte dagli osservatori che mi hanno preceduto, come parassiti endocellulari.

Distinte le forme parassitarie dalle inclusioni cellulari e dalle degenerazioni del corpo cellulare, bisogna dire della ragione per la quale i blastomiceti si trasformano nell'organismo in corpuscoli di Russell. Questi ritenne i corpuscoli a fucsina per parassiti e giustamente li classificò tra i blastomiceti, senza però dare la dimostrazione di ciò che egli affermava.

In precedenti lavori avevo dimostrato che inoculando colture pure di blastomiceti patogeni nello addome dei gatti (17) si riproducevano costantemente i tipici corpuscoli fucsinofili nella milza, nelle glandole linfatiche e nel midollo delle ossa.

Non ostante questi miei lavori, alcuni osservatori hanno continuato ad affermare che i corpuscoli di Russell sono prodotti di degenerazione cellulare e che non hanno nulla a che fare con la genesi dei tumori maligni.

Ed a confermare le osservazioni degli oppositori contribuirono non poco le ricerche del Gonella e del Guarnieri, i quali riscontrarono i corpuscoli di Russell nella congiuntivite tracomatosa, del De Simoni che trovò gli stessi corpuscoli nelle tonsille ipertrofiche, del Mazza, il quale li trovò costantemente nel rinoscleroma, del Secchi che li descrisse nell'acne cheloide e di altri osservatori che li riscontrarono in altri tessuti patologici.

Nei lavori innanzi citati io aveva affermato un fatto in base degli esperimenti d'inoculazione, ma non ne aveva trovato la ragione. Era quindi logico che gli oppositori avessero continuato ad affermare che i corpi fucsinofili erano prodotti di degenerazione cellulare (mucosa, pseudomucosa, amiloide, albuminosa, ecc.) o prodotti di alterazione del nucleo (ipercromatolisi, cariolisi, cariogenesi, metacromasia).

Dopo molte ricerche ho trovato che *la causa della trasformazione dei blastomiceti in tipici corpuscoli fucsinofili risiede nelle proprietà speciali del siero di sangue degli animali inoculati.*

Inoculando il siero di sangue dei cani immunizzati con le proteine dei blastomiceti nelle vene dei gatti contemporaneamente alle

colture virulenti dei blastomiceti patogeni, mi accorsi che la morfologia dei parassiti nei tessuti era diversa da quella che si osservava in seguito alla inoculazione endovenosa dei soli blastomiceti patogeni.

In questi ultimi anni mi è riuscito di immunizzare alcuni cani contro la inoculazione endovenosa di colture virulenti del *Saccharomyces neoformans* e del blastomicete patogeno isolato dal Plimmer e da lui gentilmente inviatomi.

La immunizzazione dei cani riesce abbastanza facilmente inoculando loro nel connettivo sottocutaneo o nella cavità addominale, più volte nel corso di parecchi mesi, le proteine blastomicetiche.

Se a questi cani trattati nel modo detto innanzi, s'inoculano in vena colture virulenti di blastomiceti patogeni, non si osserva alcun che di anormale.

Il siero di sangue di questi cani inoculato anche in quantità considerevole nelle vene dei gatti contemporaneamente al *Saccharomyces neoformans* o al blastomicete isolato dal Plimmer non ha la proprietà di salvarli dalla morte.

Il reperto anatomo-patologico dei gatti morti in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti patogeni e di siero di cani immunizzati non è diverso da quello che si osserva nei gatti morti in seguito ad inoculazione endovenosa di soli blastomiceti patogeni. Diversa solamente è la morfologia dei parassiti.

Mentre nei gatti inoculati in vena con i soli blastomiceti patogeni, questi si presentano sotto la forma capsulata, nei gatti inoculati in vena con siero di sangue di cani immuni e con blastomiceti patogeni sono ordinariamente scarsi i parassiti capsulati e sono invece numerosi i parassiti con contenuto omogeneo, intensamente colorato, e quelli che si presentano sotto la forma tipica di corpuscoli a fucsina (Fig. 4).

L'azione che il siero di sangue dei cani immunizzati esercita sui blastomiceti esistenti negli organi dei gatti è indiretta e non diretta, nel senso che il siero agisce sugli elementi cellulari e li stimola a produrre una sostanza che ne modifica la forma. Infatti se si prendono dei blastomiceti dai tessuti dei gatti e si pongono nel siero di sangue dei cani immunizzati non si verifica, neanche dopo parecchi giorni, alcuna modificazione nella forma dei parassiti.

I corpuscoli di Russell sono specialmente abbondanti nel midollo delle ossa, nella milza e nelle glandole linfatiche, ma se ne rinvengono anche in numero discreto nei reni, nel fegato e nei polmoni.

Il fenomeno della trasformazione dei blastomiceti in corpuscoli a

fucsina è analogo a quello che si verifica per alcuni batteri e che porta il nome di batteriolisi ed è perciò che è giusto denominarlo saccaromicetolisi o blastomicetolisi.

La sostanza esistente nel siero di sangue degli animali immunizzati contro i blastomiceti, capace di produrre tale trasformazione, va classificata tra gli anticorpi, accanto alla sostanza battericida, agglutinante, ecc.

Se nei gatti inoculati in addome con cultura di blastomiceti patogeni e morti dopo alcuni mesi si rinvengono soli corpuscoli a fucsina, ciò vuol dire che, morti alcuni dei parassiti, con le loro proteine hanno provocato una reazione da parte delle cellule dell'organismo, con la formazione nel siero di sangue della sostanza saccaromicetolitica, la quale ha trasformato i restanti parassiti in corpuscoli a fucsina.

Vediamo ora come spiegare l'azione di questa sostanza saccaromicetolitica sui blastomiceti.

Bisogna innanzi tutto ammettere una azione di questa sostanza sulla capsula dei blastomiceti, ciò che si deduce dal potere che acquista la membrana esterna ialina di assumere il colore di anilina, in guisa da non distinguersi più nettamente dalla membrana interna rifrangente.

Bisogna poi ammettere che la sostanza saccaromicetolitica agisca sul contenuto protoplasmatico, producendo la cromatolisi, ciò che si rileva dalla fusione avvenuta nella sostanza cromatica e dalla omogenea distribuzione di essa in tutto il corpo del parassita.

In ultimo la sostanza cromatica si fonde con la capsula ed assume l'aspetto tipico di corpuscolo a fucsina.

In questo stadio i corpuscoli a fucsina sono metacromatici, in quanto assumono col violetto di genziana una tinta alquanto diversa da quella dei parassiti normali.

Modificata la capsula, avvenuta la cromatolisi della sostanza cromatica del corpo del parassita e la sua fusione con la capsula, comincia la frammentazione delle masse cromatiche che somiglia ad un processo di gemmazione, in quanto dalla periferia di una grande massa cromatica si staccano piccole masse, le quali o rimangono per qualche tempo aderenti alla massa, da cui hanno avuto origine, o si staccano e sono inglobate dagli elementi cellulari.

Il fenomeno della saccaromicetolisi somiglia molto a quello della cariolisi.

Si potrebbe anche pensare ad un altro meccanismo di forma-

zione dei corpuscoli di Russell, ammettendo che, modificata la membrana dei parassiti dalla sostanza saccaromicetolitica ed avvenuta la cromatolisi della sostanza protoplasmatica del corpo del parassita, questa fuoriesca poco per volta attraverso la membrana modificata e dia luogo alla formazione dei tipici corpuscoli a fucsina.

Per ammettere questa seconda ipotesi bisognerebbe trovare nei tessuti molte capsule blastomicetiche vuotate del loro contenuto, ciò che non si verifica.

I corpuscoli a fucsina non sono blastomiceti vivi e le forme di riproduzione che essi mostrano sono false gemmazioni. Si spiegano a questo modo tutti i risultati negativi da me ottenuti praticando le colture dal midollo delle ossa, dalla milza e dalle glandole linfatiche dei gatti morti in seguito ad inoculazione contemporanea di siero di sangue di cani immunizzati e di colture di blastomiceti patogeni.

Dapprima io credeva che fossero forme di blastomiceti adattate a vivere solamente nell'organismo ed incapaci di riprodursi nei terreni artificiali di nutrizione. In questi ultimi anni mi sono convinto che si tratta di forme incapaci di riprodursi non solo nei terreni di nutrizione, ma anche nell'organismo. Infatti ho inoculato emulsioni in acqua sterile di milza e di midollo delle ossa appartenente ai gatti morti in seguito ad inoculazione endovenosa di siero di sangue di cani immuni e di blastomiceti patogeni e contenente soli corpuscoli a fucsina nelle vene di gatti, cani, cavie e conigli e finora non ho osservato alcun che di anormale negli animali inoculati.

Sappiamo che nell'organismo sano esistono numerosi blastomiceti e ricerche fatte in proposito hanno dimostrato che se ne trovano sulla cute, sulla mucosa boccale, intestinale, vaginale, ecc. Ora per lesioni avvenute sulla cute e sulle mucose questi blastomiceti possono penetrare nei tessuti e dar luogo dopo la loro morte alla formazione della sostanza saccaromicolitica, la quale trasformerebbe in corpuscoli a fucsina i blastomiceti ancora vivi. Non sarebbe quindi strano di rinvenire corpuscoli a fucsina in un organismo sano.

Già si sa che in tessuti patologici dell'uomo diversi dai tumori maligni si rinvengono corpuscoli a fucsina. Finchè ricerche rigorose non abbiano dimostrato che con la inoculazione di colture pure di blastomiceti si possono produrre simili lesioni anatomo-patologiche, non siamo autorizzati a ritenere che quei corpuscoli a fucsina sieno la causa della lesione e possiamo ritenere invece che essi

sieno quelli accidentali della cute e delle mucose che, penetrati nei tessuti, abbiano dato luogo alla formazione dell'anticorpo e si sieno trasformati iu corpuscoli fucsinofili.

Assodato il fatto che nel siero di sangue degli animali trattati con le proteine dei blastomiceti patogeni esiste un anticorpo capace di trasformare i parassiti in tipici corpuscoli fucsinofili, era necessario vedere, se inoculando agli animali le proteine dei blastomiceti non patogeni, si formava nel siero di sangue lo stesso anticorpo.

Per queste ricerche sono state utilizzate colture di blastomiceti non patogeni isolati dall'aria. Le proteine di questi blastomiceti sono state ripetutamente inoculate nel connettivo sottocutaneo dei cani nel corso di due, tre e più mesi.

Si è poi raccolto il siero di sangue di questi cani e si è inoculato nelle vene dei gatti contemporaneamente al blastomicete, la cui proteina era servita per preparare il cane.

Dopo parecchi giorni si sono ammazzati i gatti e si sono fatti preparati da tutti gli organi. Nelle sezioni di tutti gli organi si sono riscontrati corpuscoli a fucsina, più abbondanti nella milza, nel midollo delle ossa, nelle glandole linfatiche; meno abbondanti nei reni, nei polmoni e nel fegato.

Sicchè in base al risultato di questi esperimenti si può affermare che *non solamente le proteine dei blastomiceti patogeni, ma anche quelle dei blastomiceti non patogeni sono capaci di dar luogo alla formazione di un anticorpo, capace di produrre la saccaromicetolisi, trasformando i blastomiceti in corpuscoli a fucsina.*

Nei tumori maligni a lungo decorso, come ha dimostrato il Binaghi (18) i blastomiceti si trovano sempre sotto la forma di corpuscoli a fucsina e si spiega quindi la impossibilità di ottenere in questi casi le colture dei parassiti.

Solamente in quei tumori maligni dell'uomo, nei quali la sostanza saccaromicetolitica del siero di sangue non ha ancora trasformati tutti i parassiti in corpuscoli a fucsina, è possibile ottenere le colture.

Se, riscontrando nei tumori maligni dell'uomo soli corpuscoli fucsinofili, riteniamo che essi sieno la causa della lesione, è perchè persone degne di fede (Plimmer-Leopold) hanno ottenuto colture di blastomiceti dai carcinomi dell'uomo e perchè con colture pure di blastomiceti patogeni si sono riprodotti tumori epiteliali e connettivali nei cani (Sanfelice).

Non possono quindi alle lesioni anatomo-patologiche prodotte dai blastomiceti patogeni applicarsi i criteri stabiliti dal Koch per ritenere un parassita causa di una data infezione.

Innanzi tutto non è un criterio per ritenere patogeno un blastomicete il trovare in alcuni tessuti costantemente delle forme blastomicetiche sotto forma di corpuscoli a fucsina, perchè la loro presenza può essere accidentale.

In secondo luogo sappiamo che, quando i blastomiceti si trovano nei tessuti sotto forma di corpuscoli di Russell, non sono più coltivabili e perciò il non ottenere la coltura non è una ragione per negare che essi sieno causa di un dato processo patologico.

Dopo quanto ho esposto appare chiaro quale è il *destino dei blastomiceti inoculati nell'organismo*.

Indubbiamente una parte di essi si elimina attraverso i reni. Negli animali morti in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti si riscontrano quasi costantemente nei glomeruli e nei canalini uriniferi molti blastomiceti.

Dei blastomiceti che rimangono nell'organismo, alcuni muoiono e danno con le proteine la reazione da parte del siero di sangue, il quale poco per volta trasforma i blastomiceti vivi in corpuscoli a fucsina.

I blastomiceti nell'organismo possono anche subire la degenerazione calcarea dovuta al deposito di fosfato di calce nella membrana esterna. È tutt'altro che raro riscontrare nei reni dei gatti, dei cani, dei conigli e delle cavie, morte in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti patogeni, masse calcaree più o meno grandi dovute alla degenerazione calcarea da cui sono stati colpiti gruppi di parassiti.

Nel siero di sangue degli animali resi immuni contro la infezione blastomicetica e di quelli con infezione in atto ho ricercato la sostanza sensibilizzatrice.

Dalle ricerche di Bordet e Gengou (19) sappiamo che la proprietà batteriolitica e citolitica di un siero proviene da un anticorpo specifico chiamato sostanza sensibilizzatrice dal Bordet, Immunkörper dall'Ehrlich, sostanza fissatrice o fissatore dal Metschnikoff.

Il siero di sangue di un cavallo immunizzato contro il bacillo della peste contiene una sostanza sensibilizzatrice che conferisce al bacillo della peste la proprietà di fissare l'alessina.

Nella prima serie di ricerche mi sono servito di cani che erano stati immunizzati contro il *Saccharomyces neoformans* e contro il blastomicete patogeno isolato dal Plimmer.

Tutti i cani furono immunizzati con ripetute inoculazioni di proteine blastomicetiche nel connettivo sottocutaneo.

Il primo cane della serie fu inoculato la prima volta con le proteine blastomicetiche il 22 dicembre 1900.

Dopo circa un anno di trattamento fu inoculato in vena giugulare con una coltura virulenta di *Saccaromyces neoformans* e superò la infezione.

Il secondo cane fu trattato con le stesse proteine blastomicetiche dal 25 gennaio di quest'anno fino al 30 aprile. Anche questo secondo cane superò la inoculazione endovenosa di colture virulenti.

Il terzo cane fu trattato con le proteine del blastomicete isolato dal Plimmer. Anche questo cane fu inoculato in vena con la coltura virulenta e non morì.

Il quarto cane fu trattato con le stesse proteine ed in otto mesi ebbe venti inoculazioni sottocutanee.

Anche questo cane superò la inoculazione endovenosa della coltura virulenta.

Nella seconda serie di ricerche mi sono servito di gatti e conigli che con lo stesso metodo erano stati immunizzati contro i blastomiceti patogeni.

Oltre allo studio delle proprietà del siero di sangue degli animali immunizzati ho fatto anche quello degli animali con infezione in atto.

A questo scopo s'inocularono colture virulenti di *Saccharomyces neoformans* e del blastomicete patogeno isolato dal Plimmer nelle vene di cani, gatti e conigli e quando dopo qualche tempo apparvero i sintomi della infezione si raccolse il siero di sangue per lo studio degli anticorpi.

Si raccolse il sangue da quattro cani con infezione in atto, di cui due furono inoculati in vena con colture di *Saccharomyces neoformans* e due con il blastomicete del Plimmer. Il siero dei primi due fu raccolto dopo 35 e 40 giorni; quello degli altri due dopo 38 e 45 giorni.

Pochi giorni dopo il salasso morirono i quattro cani con il reperto anatomo-patologico caratteristico della infezione blastomicetica diffusa.

Dei tre gatti con infezione in atto da cui fu raccolto il siero di sangue per lo studio degli anticorpi, il primo fu inoculato in vena con coltura di *Saccharomyces neoformans*, gli altri due con il blastomicete isolato dal Plimmer. Il salasso fu fatto dopo 20, 30 e 32 giorni dalla praticata inoculazione. Anche questi 3 gatti morirono pochi giorni dopo praticato il salasso con infezione blastomicetica diffusa.

Tre conigli inoculati in vena giugulare con colture di *Saccharomyces neoformans* furono salassati dopo 20, 25 e 30 giorni dalla praticata inoculazione.

Ora dirò del metodo seguìto per lo studio degli anticorpi secondo quanto hanno consigliato il Bordet ed il Gengou.

Innanzitutto ho preparato il sicro emolitico inoculando nel connettivo sottocutaneo di un coniglio nel corso di 15-20 giorni quindici centimetri cubici di sangue di pollo. Se il siero di coniglio si aggiunge alla emulsione in liquido fisiologico delle emazie di pollo, queste sono in breve tempo distrutte.

Si riscalda il siero emolitico di coniglio per 1/2 ora a 56° C e si aggiunge nella dose di 20 gocce a dieci gocce della emulsione di emazie di pollo in liquido fisiologico.

D'altra parte si preparano emulsioni di *Saccharomyces neoformans* e del blastocimete del Plimmer in liquido fisiologico e ad otto gocce di queste emulsioni si aggiungono 24 gocce del siero degli animali immuni o degli animali con infezione in atto riscaldato 1/2 ora a 56° C e 4 gocce di siero normale di cane, gatto, coniglio immune o con infezione in atto.

Cinque a sei ore dopo la preparazione di questi miscugli si aggiunge a ciascuno una goccia del miscuglio di siero di coniglio emolitico riscaldato e di emazie di pollo.

Per controllo si preparano anche dei miscugli nei quali il siero riscaldato degli animali immuni o con infezione in atto è sostituito dal siero normale riscaldato della stessa specie animale.

Se i blastomiceti sono sensibilizzati da un anticorpo specifico, assorbono e fissano l'alessina ed allora il miscuglio non contenendo più alessina libera, non distrugge più le emazie di pollo.

Se al contrario il siero degli animali immuni e di quelli con infezione in atto non contiene una sostanza sensibilizzatrice per i blastomiceti, si unisce l'alessina rimasta libera con la sostanza sensibilizzatrice del siero di coniglio emolitico e le emazie di pollo sono distrutte.

Dalle numerose ricerche fatte risulta che *nel siero di sangue degli animali immuni esiste una sostanza sensibilizzatrice* e però le emazie di pollo rimangono intatte.

Prima di me il Malvoz (20) ha fatto una serie di esperienze ed è venuto alla medesima conclusione.

Non esiste al contrario nel siero degli animali con infezione in atto la sostanza sensibilizzatrice e perciò le emazie di pollo sono distrutte.

Questo metodo mi ha permesso di predire se i cani ed i conigli inoculati in vena con colture di blastomiceti patogeni sarebbero morti oppur no. Infatti ogni volta che ho constatato nel siero di sangue la presenza della sostanza sensibilizzatrice, gli animali hanno sopravvissuto ed ogni volta che nel siero di sangue non ho constatato la presenza di detta sostanza, gli animali sono morti.

Recentemente il Brouha (21) ha ricercato gli anticorpi nel siero di sangue degli individui ammalati di cancro ed è venuto alla conclusione che nel siero non esiste sostanza sensibilizzatrice per i blastomiceti ritenuti causa della lesione. Da ciò nega la importanza dei blastomiceti nella genesi dei tumori maligni. Ora se egli avesse fatto esperimenti negli animali con infezione in atto, avrebbe visto che l'*assenza di sostanza sensibilizzatrice nel siero degli individui affetti da cancro invece d'infirmare conferma la importanza dei blastomiceti nella genesi dei tumori maligni.*

In altro lavoro riferirò sulle altre proprietà del siero di sangue degli animali immunizzati contro i blastomiceti patogeni.

IV.

Inoculazioni dei blastomiceti nelle vene.

Le inoculazioni endovenose dei blastomiceti patogeni danno risultati positivi con maggiore frequenza che non le inoculazioni negli organi.

Alcuni dei cani inoculati in vena giugulare con il *Saccharomyces neoformans* sono morti dopo 15-20 giorni, altri dopo uno, due e tre mesi.

In genere tutti gli animali, parecchi giorni dopo la inoculazione, hanno presentato un notevole dimagramento.

Le lesioni che presentano i cani alla autopsia possono essere diffuse a quasi tutti gli organi ovvero limitate ad alcuni organi solamente.

Di tutti i cani inoculati in vena solamente uno ucciso dopo alcuni mesi ha presentato un tumore nella milza.

I cani morti con infezione diffusa presentano ingrossate le glandole linfatiche ascellari ed inguinali; la milza alquanto ingrandita con i follicoli linfatici sporgenti sulla superficie; le glandole linfatiche addominali considerevolmente ingrandite; nei reni, specialmente nella sostanza corticale, si osservano molti noduli di colorito bianco-giallastro; nel fegato qualche volta anche si osservano dei piccoli noduli, i polmoni presentano noduli piuttosto piccoli, di colorito grigiastro, su tutta la superficie; simili lesioni si vedono nel miocardio, nella sostanza corticale del cervello, nella pia meninge, nella retina.

I cani che muoiono in preda a questa infezione diffusa, oltre al considerevole dimagramento, barcollano nel camminare, spesso cadendo da un lato e non vedono per l'avvenuto intorbidamento della cornea.

Tutti questi disturbi si spiegano con le lesioni dovute alle localizzazioni dei parassiti nel sistema nervoso centrale e nell'occhio.

Facendo colture da tutti gli organi che presentano lesioni, costantemente si hanno risultati positivi. Nei preparati a fresco fatti per dilacerazione da tutti gli organi che presentano lesioni si osservano scarse forme parassitarie. Il più delle volte bisogna ripetere più volte il preparato per poter vedere alcuni parassiti.

Le forme parassitarie hanno ordinariamente lo stesso aspetto di quelle che si vedono nell'organismo della cavia, del coniglio e del ratto bianco; sono rotonde, di varia grandezza con una membrana rifrangente a doppio contorno e con uno o più grandi rifrangenti nello interno. La membrana rifrangente, variamente spessa, solamente in alcuni parassiti è circondata da un'altra membrana ialina a doppio contorno.

Di queste forme parassitarie alcune sono libere ed altre endocellulari.

Nelle sezioni delle glandole linfatiche si osserva un considerevole ingros-

samento dei follicoli linfatici e dei cordoni follicolari. Negli spazi linfatici si nota un leggiero aumento degli elementi linfoidi. Le forme parassitarie, piuttosto scarse, si riscontrano solamente nei cordoni follicolari e sono o libere o endocellulari simili a quelle che si osservano nei tessuti delle cavie e dei conigli. Non si vedono tipici corpuscoli a fucsina.

Nella milza i follicoli linfatici ed i cordoni follicolari sono considerevolmente ingrossati. In questi ultimi solamente si notano parassiti.

Il midollo delle ossa lunghe è molto ricco di elementi linfoidi ed ordinariamente contiene scarse forme parassitarie.

I reni presentano lesioni più importanti. Tanto nella parte corticale che in quella midollare, vi sono dei noduli costituiti da cellule epitelioidi grandi con nucleo ovale, colorato debolmente, e protoplasma relativamente grande. Tra queste cellule vi sono scarsi leucociti. In mezzo a questi accumuli di cellule si vedono alle volte dei glomeruli normali e dei canalini uriniferi, le cui cellule epiteliali contengono spesso goccioline adipose. In alcuni glomeruli vi è un essudato costituito da cellule endoteliali e da leucociti. Non è raro riscontrare dei parassiti nelle anse glomerulari e nella capsula del Bowmann. Forme parassitarie piuttosto scarse si vedono nei noduli costituiti dalle cellule epitelioidi, libere o endocellulari.

Nel fegato i vasi capillari sono dilatati e contengono numerosi leucociti. Tra le cellule epatiche si riscontrano alle volte dei noduli miliari, i quali sono costituiti da grosse cellule rotonde con nucleo grande, debolmente colorato.

I noduli del cervello, della retina, delle meningi, dei polmoni presentano la medesima struttura.

Che il processo infettivo determinato nei cani con la inoculazione in vena del blastomicete patogeno sia realmente dovuto al parassita inoculato, non credo vi possa essere dubbio alcuno, per la ragione che con le colture ottenute dagli organi di un cane si possono riprodurre in altri cani le medesime lesioni.

Solamente il Busse negò che le lesioni fossero dovute ai blastomiceti patogeni inoculati. Lo Sternberg nel suo ultimo lavoro dichiara irragionevole l'affermazione del Busse, come già io feci in un precedente lavoro.

Le neoformazioni prodotte nei cani con le inoculazioni endovenose del *Saccharomyces neoformans* sono di natura connettivale.

Questo fatto è stato confermato completamente dallo Sternberg (22). Come ho già detto innanzi siamo discordi nella interpretazione delle lesioni.

Mentre lo Sternberg crede che si tratti di un tessuto di granulazione del tutto speciale, io credo che si tratti di lesioni di natura neoplastica.

Le lesioni prodotte nei cani hanno molta somiglianza con quelle osservate da Busse negli organi della donna morta in seguito a

sarcoma molle della tibia. Il Busse trovandosi innanzi ad un caso nuovo, prodotto da un parassita nuovo, ha voluto interpretarlo con le comuni e scolastiche nozioni di anatomia patologica e però lo ha battezzato per una forma di piemia. Si noti però che la lesione primitiva della tibia, da valenti chirurgi dal lato clinico e dallo stesso Busse dal lato istologico, era stata diagnosticata per una forma di sarcoma molle, per una lesione cioè di natura neoplastica. Ora o il Busse ha errato prima o ha errato dopo. Io credo che abbia preso un grave errore dopo, considerando come una forma di piemia una forma di sarcomatosi diffusa.

Praticando inoculazioni endovenose nei cani si hanno multiple localizzazioni dei pasassiti e quindi multiple neoformazioni, ma praticando inoculazioni in organi si possono avere dei casi simili a quello osservato dal Busse, cioè a dire tumore connettivale nel sito primitivo d'inoculazione e consecutiva diffusione negli organi, Il decorso è più rapido quando la inoculazione si pratica nelle vene, meno rapido quando la inoculazione si pratica negli organi.

Alcuni cani morti in seguito alla inuculazione endovenosa dei blastomiceti patogeni non hanno presentato alla sezione lesioni diffuse in tutti gli organi, ma solamente nei reni e qualche volta nella milza. Questi reperti anatomo-patologici sono certamente da distinguersi nettamente da quelli innanzi descritti. Nelle milze di alcuni di questi cani alle volte ho osservato dei noduli della grandezza di piccole nocciuole.

Le lesioni istologiche notate nei reni e nella milza di questi cani sono perfettamente identiche a quelle che si riscontrano nei cani morti con infezione diffusa.

In un mio precedente lavoro (23) pubblicato intorno all'azione patogena dei blastomiceti, a proposito dei risultati ottenuti con le inoculazioni endovenose del *Saccharomyces neoformans* mi esprimeva nel modo seguente: « Certo si è che se i cani inoculati in vena col *Saccharomyces neoformans*, invece di morire dopo un mese, un mese e mezzo, fossero morti della stessa infezione dopo otto, dieci mesi (e son sicuro che di questi casi me ne capiteranno) avrebbero presentato delle lesioni connettivali molto più estese, con parassiti non più coltivabili. »

Ciò che io prevedeva è accaduto in uno dei cani inoculato in vena giugulare con coltura pura del *Saccharomyces neoformans* ed ucciso dopo sei mesi e mezzo, perchè apparentemente non presentava nulla di anormale, ad eccezione di un discreto dimagramento.

Alla sezione non si trovò altro che un tumore nella milza.

Il tumore veduto dalla parte ventrale della milza era del volume e della forma di una castagna e veduto dalla parte dorsale era distinto in due parti, di cui una sferica, della grandezza di una ciliegia, l'altra costituita da due noduli, l'uno più grande, l'altro più piccolo, riuniti fra loro da un istmo abbastanza grosso.

Il tumore appariva dello stesso colorito della milza normale, tranne in alcune parti, di colorito rosso scuro.

Quanto alla consistenza, il tumore era piuttosto molle.

Nella sezione il tumore appariva costituito di un tessuto compatto, senza alcuna delimitazione fra le diverse parti che lo costituivano.

Dalle diverse parti del tumore furono praticate colture, ma non si ebbero risultati positivi.

Il tumore è costituito da cellule con nuclei grandi e debolmente colorati, perfettamente simili alle cellule linfoidi, che costituiscono la parte principale della polpa splenica.

Tra i gruppi di cellule costituenti il tumore vi sono spazi più o meno grandi riempiti di globuli rossi.

Sparse fra le cellule del tumore si vedono masse più o meno grandi di pigmento bruno.

Là dove sono grandi accumuli di corpuscoli rossi si osservano cellule in via di disfacimento con residui di cromatina.

Nelle sezioni degli organi non si riscontrò alcuna lesione.

Nel tumore vi sono parassiti endocellulari e liberi sotto forma di corpuscoli a fucsina.

La forma che i parassiti presentano nel tumore spiega il risultato negativo delle colture.

Quanto alla natura del tumore credo possa affermarsi con certezza che si tratta di un sarcoma.

Sono stati descritti fibromi, angiomi e sarcomi della milza. I sarcomi primitivi sono piuttosto rari, ma ne esistono descrizioni nella letteratura, tra le quali mi piace ricordare quella del Weichselbaum (24).

I gatti e le pecore morte in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti patogeni hanno presentato le stesse lesioni dei cani.

Nei tessuti di tutti gli animali morti dopo breve tempo e con localizzazioni multiple in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomiceti patogeni non si riscontrano i parassiti sotto la forma di corpuscoli a fucsina. Probabilmente ciò dipende dal fatto che gli animali muoiono prima che nel siero di sangue si sia formata la quantità di sostanza saccaromicetolitica necessaria per produrre la trasformazione dei parassiti.

BIBLIOGRAFIA.

1. *On the Aetiology and Histology of Cancer with special Reference to recent Work on the Subject.* The Practitioner, 1899.
2. *Untersuchungen zur Aetiologie des Carcinoms und ueber die pathogenen Blastomyceten.* Archiv f. Gynäkologie, vol. 61, 1899.
3. *Ueber Hefepilze und Geschwülst-Bildung.* Beiträge zur klinischen Chirurgie, vol. XXV, 1899.
4. *First annual Report of Work on the Etiology of cancer.* First annual Report of the cancer committee. Boston, 1900.
5. *Les théories parasitaires du cancer.* Annales de l'Institut Pasteur, 1901.
6. *The protozoon of cancer.* The american Journal of the medical Sciences, 1901.
7. *Experimentelle Untersuchungen ueber pathogenen Hefen.* Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie, vol. XXXII.
8. *A case of blastomycetic Dermatitis in Man.* The Johns Hopkins Hospital Reports, vol. I.
9. *I blastomiceti nel tracoma.* Bollettino della Società di medici e naturalisti in Cagliari, vol. I.
10. *Ricerche sulla etiologia della congiuntivite tracomatosa.* Società toscana di Scienze naturali, 1896.
11. *Das Vorkommen von Blastomyceten bei der Keloidakne.* Monatshefte f. praktische Dermatologie, 1896.
12. *Ueber das Vorkommen von Blastomyceten in hypertrophischen Tonsillen.* Centralblatt f. Bakteriologie, vol. XXII, 1897.
13. *Il bacillo di Fisch e quello di Friedlaender e Pfeiffer.* Supplemento al Policlinico, 1897.
14. *Sull'azione patogena dei blastomiceti.* Memoria terza. Questi annali, volume II, 1896.
15. *Ueber die pathogene Wirkung der Blastomyceten.* V. Abhandlung. Zeitschrift f. Hygiene, vol. XXIX, 1898.
16. *Sull'azione patogena dei blastomiceti.* Memoria terza. Questi annali, volume VI, 1896.
17. *Ueber die experimentelle Erzengung der Russell'schen Fuchsinkörperchen.* Centralblatt f. Bakteriologie, vol. XXIII, 1898.
18. *Ueber das Vorkommen von Blastomyceten in den Carcinomen.* Zeitschrift f· Hygiene, vol. XXIII, 1896.
19. *Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des serum antimicrobiens.* Annales de l'Institut Pasteur, 1901.
20. *Le diagnostic des maladies infectieuses par les anticorps microbiens.* Annales de la Société médico–chirurgicale de Liège, 1901.
21. *Sur les propriétés du serum des cancereux au point de vue des anticorps des levures.* Centralblatt f. Bakteriologie, vol. XXX, 1901.
22. *Experimentelle Untersuchungen ueber pathogene Hefen.* Beiträge zur pathologischen Anatomie und allgmeinen Patologie, 1902.
23. *Ueber die pathogene Wirkurg der Blastomyceten.* V. Abhandlung. Zeitschrift f. Hygiene, vol. XXIX, 1898.
24. *Primäre Sarkom der Milz.* Virchow's Archiv, vol. 88.

APPENDICE.

PUBBLICAZIONI DELL'AUTORE INTORNO ALL'AZIONE PATOGENA DEI BLASTOMICETI COME CONTRIBUTO ALLA ETIOLOGIA DEL CANCRO.

1. *Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti.* Annali d'igiene sperimentale, vol. IV, 1894.
2. *Ueber eine für Tiere pathogene Sprosspilzart und ueber die morphologische Uebereinstimmung, welche sie bei ihvem Vorkommen in den Geweben mit den vermeintlichen Krebscoccidien zeigt.* Centralblatt f. Bakteriologie, vol. XVII, 1895.
3. *Ueber einen neuen pathogenen Blastomyceten, wehher innerhalb der Gewebe unter Bildung kalkartig-aussehender Massen degeneriert,* Centralblatt f. Bakteriologie, vol. XVIII, 1895.
4. *Sull'azione patogena dei Blastomiceti come contributo alla etiologia dei tumori maligni.* Il Policlinico, vol. II, C., 1895.
5. *Ueber die pathogene Wirkung der Blastomyceten.* I. Abhandlung. Zeitschrift f. Hygiene, 1895.
6. *Ueber die pathogene Wirkung der Blastomyceten.* II Abhandlung. Zeitschrift f. Hygiene, 1896.
7. *Ueber die pathogene Wirhung der Blastomyceten.* III Abhandlung. Zeitschrift f. Hygiene, 1896.
8. *Ueber die Immunität gegen Blastomyceten.* Centralblatt f. Bakteriologie, 1896.
9. *Sull'azione patogena dei blastomiceti e della etiologia blastomicetica dei neoplasmi.* Rivista italiana di Patologia generale, 1896.
10. *Ueber die pathogene Wirkung der Blastomyceten.* IV Abhandlung. Zeitschrift f. Hygiene, 1897.
11. *Ueber die experimentelle Erzengung der Russell' schen Füchsinkörperchen.* Centralblatt f. Bakteriologie, 1898.
12. *Ueber die pathogene Wirkung der Blastomyceten.* V. Abhandlung. Zeitschrift f. Hygiene, 1898.
13. *Ein weiterer Beitrag zur Aetiologie der bösartigen Geschwülst.* Centralblatt f. Bakteriologie, 1898.
14. *Ueber die pathogene Wirkung der Blastomyceten.* VI Abhandlung. Zeitschrift f. Hygiene, 1902.
15. *Zelleinschlüsse - Zellentartungen und endocelluläre Parasiten bei bösartigen Geschwülsten.* Centralblatt f. Bakteriologie, 1902.
16. *Die Antikörper des Blatserums mit Blastomyceten behandelter Thiere.* Centralblatt f. Bakteriologie, 1902.
17. *Die Morphologie der Blastomyceten in Bezug den Antikörper des Blutserums.* Centralblatt f. Bakteriologie, 1902.
18. *La Saccaromicetolisi.* Riforma medica, 1902.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA II.

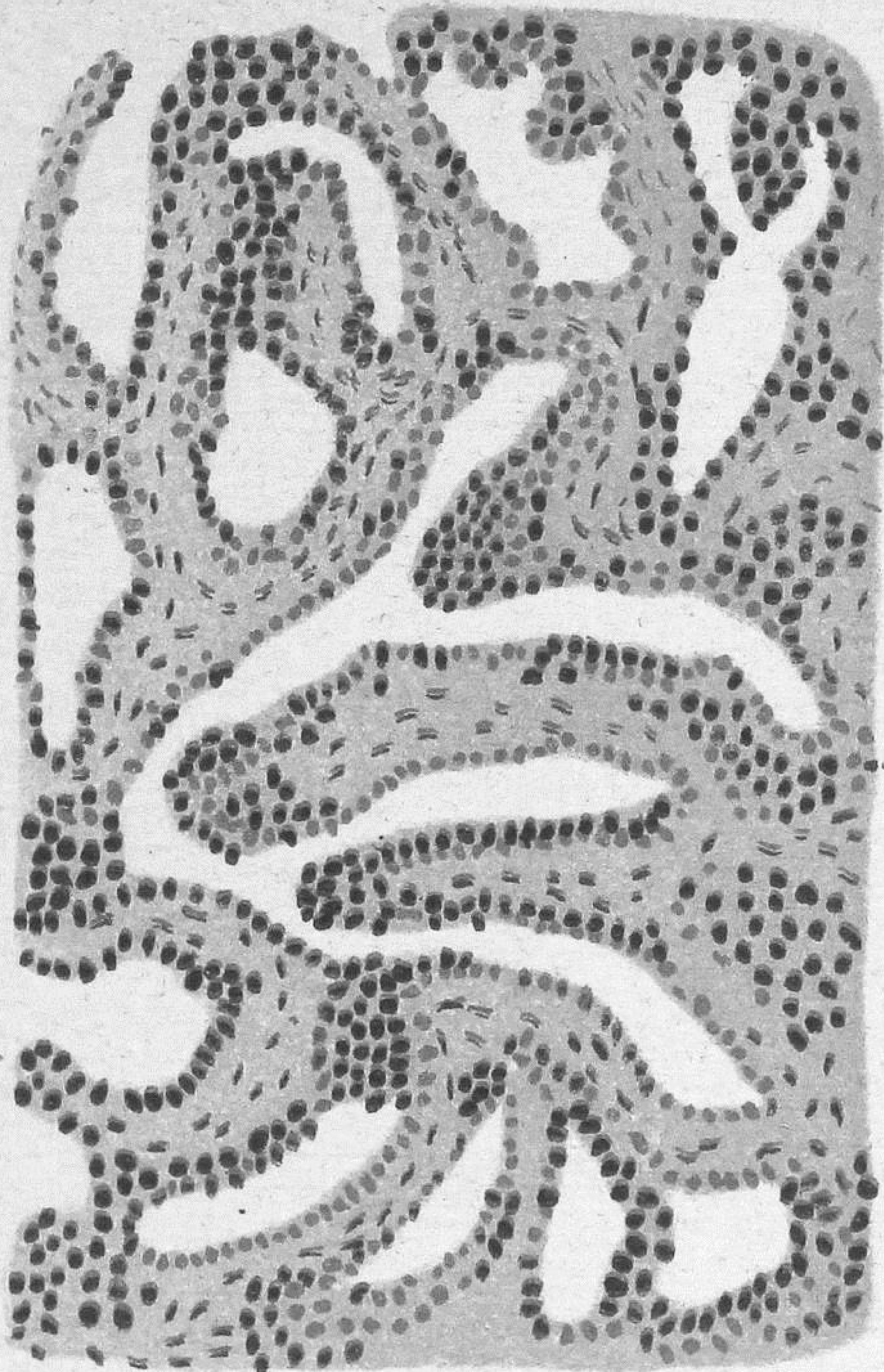
Fig. 1. Sezione del tumore prodotto nella glandola mammaria di una cagna con la inoculazione del *Saccharomyces neoformans*. Oc. 4. Ob. A. Zeiss.

Fig. 2. Sezione della parte periferica dello stesso tumore. Oc. 3. Ob. C. Zeiss.

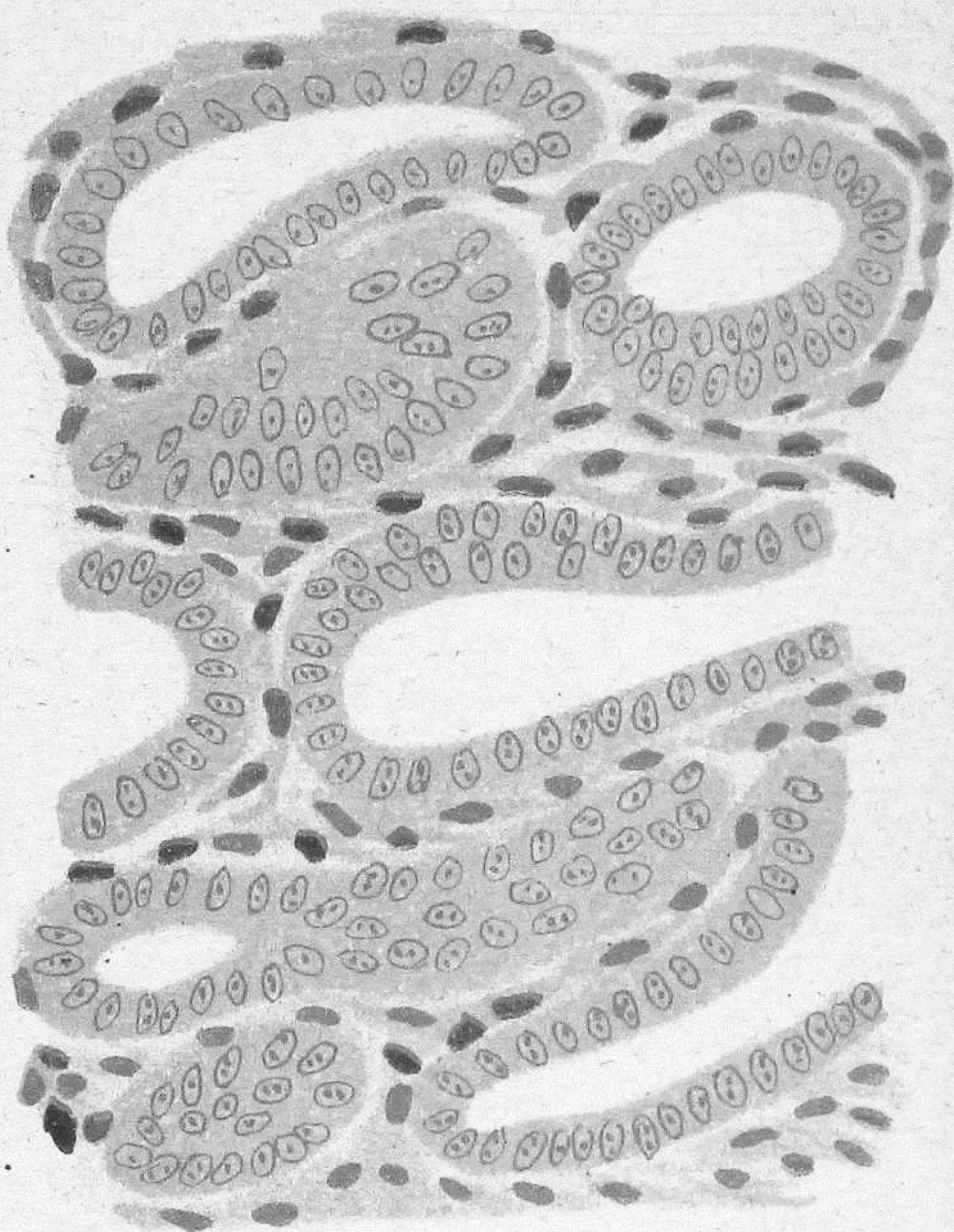
Fig. 3. Sezione di una glandola linfatica inguinale della stessa cagna con metastasi cancerigna. Oc. 3. Ob. C. Zeiss.

Fig. 4. Sezione di midollo del femore di gatto morto in seguito ad inoculazione endovenosa di blastomicete patogeno (*Saccharomyces neoformans*) e di siero di cane trattato con le proteine dello stesso blastomicete. Si osserva la saccaromicetolisi dei parassiti fino alla formazione dei tipici corpuscoli di Russell, liberi ed endocellulari. Oc. 3. Ob. 1/12 immersione. Koristka.

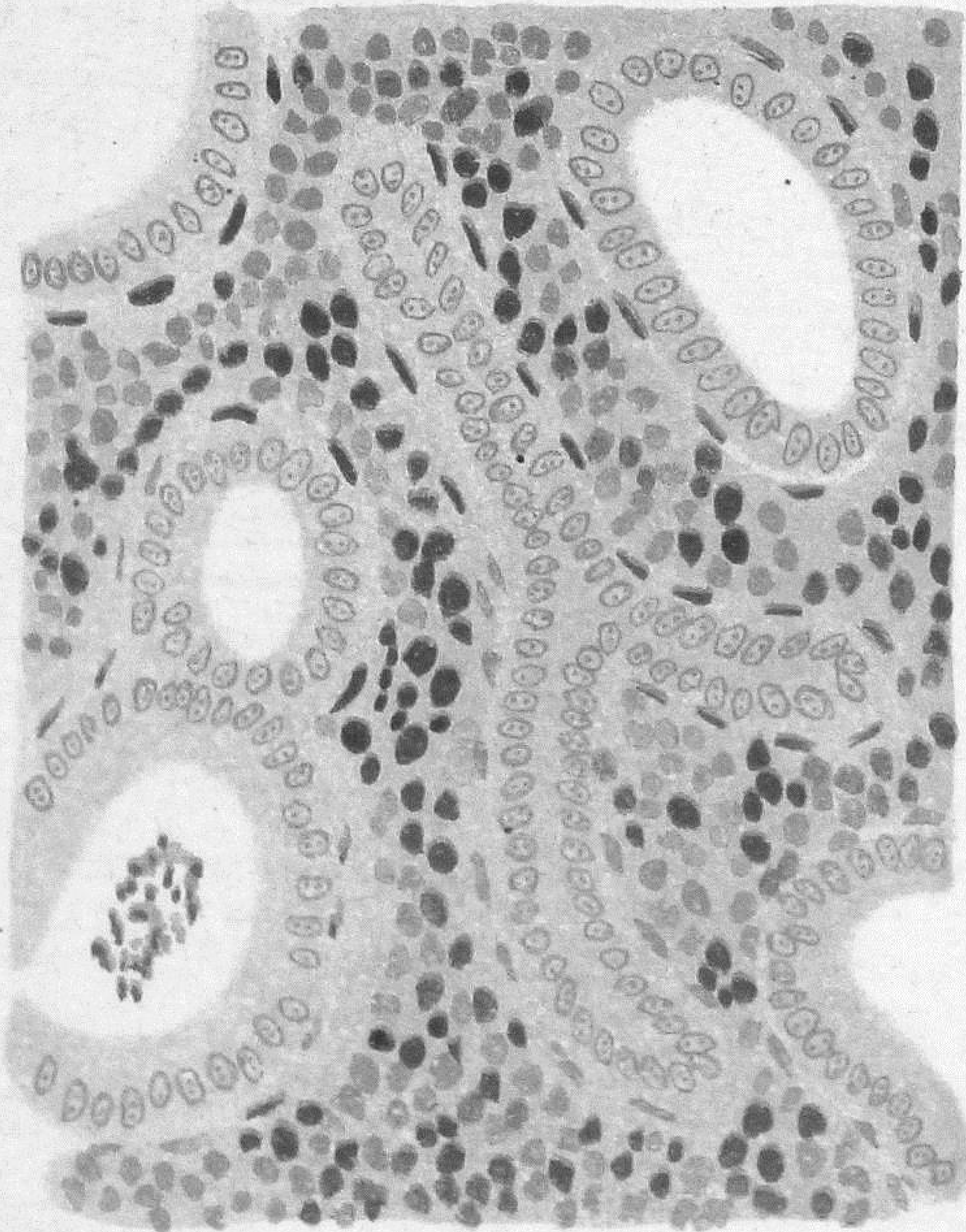
1



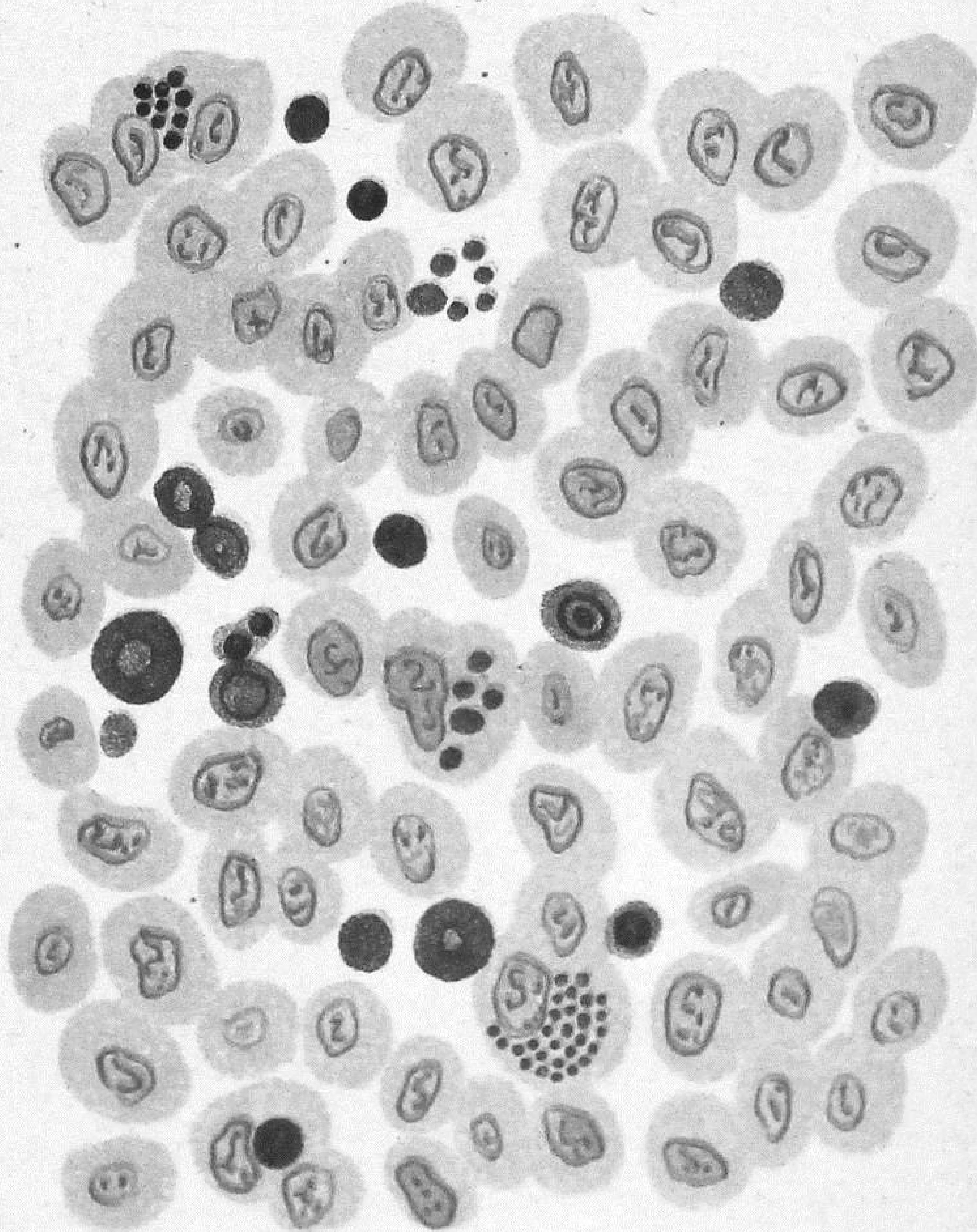
2



3



4



Sanfelice dis.

Lit. Salussolia, Torino.